

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 533

TITRE DE LA THÈSE

**LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE
UTILISANT
LES SÉRUMS ANTI-COMPLÉMENT DE COBAYE
MISE AU POINT ET APPLICATIONS PRATIQUES**
(Travail du Laboratoire de Bactériologie, Immunologie, Virologie
et du Laboratoire d'Hygiène)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON
le 8 Juin 1967

par

Jean-Paul RUEL

né le 15 Juin 1939

à VEAUCHE (Loire)

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 533

TITRE DE LA THÈSE

**LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE
UTILISANT
LES SÉRUMS ANTI-COMPLÉMENT DE COBAYE
MISE AU POINT ET APPLICATIONS PRATIQUES**
(Travail du Laboratoire de Bactériologie, Immunologie, Virologie
et du Laboratoire d'Hygiène)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 8 Juin 1967

par

Jean-Paul RUEL

né le 15 Juin 1939

à VEAUCHE (Loire)

Année 1967 - 1968

THÈSE DE LA FACULTÉ

LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE
UTILISANT
LES SÉRUMS ANTI-COMPLÈMENT DE COBAYE
MISE AU POINT ET APPLICATIONS PRATIQUES
(Travail de Laboratoire de Microbiologie, Immunologie et Pathologie
et du Laboratoire d'Électronique)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine
de Lyon le 15 Juin 1967



Jean-Paul RUELL

né le 15 Juin 1939

à VEAUCHE (Loire)

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J. F. CIER

Assesseurs :

M. M. LEVRAT
M. J. DOURCHE

Conseiller Administratif :

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - GARIN
GATE - MARTIN - GABRIELLE - SANTY -
DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN -
ROCHET - POLLOSSON - ENSELME -
WERTHEIMER - SARROUY - BANSILLON -
DECHAUME - LACROIX.

PROFESSEURS

MM.

J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTIUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
M. CHAMRON	Chimie organique et toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du Travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique

P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
L. FAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie pathologique
P. GIRARD	Pathologie générale et expérimentale
M. GIRARD	Clinique médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie médicale
P. GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique médicale infantile et Hygiène du 1er âge
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique médicale infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie générale et pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique stomatologique
J. MARION	Clinique de chirurgie et d'Orthopédie infantiles
J. DORCHE	Matière médicale et Législation pharmaceutique
L. MANSUY (1)	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie
H. LIARAS (1)	Clinique chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de Chirurgie cardiaque
M. PONT (1)	Médecine générale
J. TRAEGER (1)	Pathologie métabolique et rénale
J. MATHIEU	Clinique gynécologique
G. FAUCON	Biologie médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des Maladies infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
D. VINCENT	Biochimie appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie biologique et médicale
X.....	Pathologie chirurgicale
X.....	Clinique neuro-psychiatrique de d'Hygiène mentale
X.....	Physiologie et Pathologie obstétricales
X.....	Hygiène et Action sanitaire et sociale
X.....	Histologie et Embryologie

(1) - Professeurs à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du Travail
THIVOLET	Hygiène
MALLEIN	Chimie analytique
PINET	Electro-Radiologie
COLOMB	Dermatologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM.

CREYSSSEL R.	Chimie biologique
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES Fr.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et Puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENCOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIROD	Histologie et Embryologie
GRAS	Chimie biologique

MM.	
COLIN	Médecine légale
BERTRAND	Chimie biologique
MARET	Chirurgie générale
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
CHOLLAT	Electro-radiologie
FLEURETTE	Bactériologie
FLANDROIS	Physiologie
MOREL	Hématologie
TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
FREDERICH	Pharmacologie
DAUDET	Chirurgie infantile
BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
BOUVIER	Rhumatologie
FREYCON	Pédiatrie
LAPRAS	Neuro-chirurgie
PELLET	Physiologie
DUQUESNEL	Electroradiologie
DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
MOULIN	Dermato-Vénérologie
PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phthisiologie
PALIARD	Médecine générale et Thérapeutique
MORGON	O. R. L.
FAUPERT-RAVAULT M.	Ophthalmologie
MOTIN	Anesthésiologie
PASQUIER	Médecine générale et Thérapeutique
VAUZELLE	Anatomie pathologique
CZYBA	Histologie et Embryologie
CABANAC	Physiologie
TOURAINÉ	Pneumo-phthisiologie
BEL	Médecine générale et Thérapeutique
CHARVET	Gynécologie obstétrique
BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
VILLIERS	Chirurgie générale
LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explorations fonctionnelles
COURJON	Neuro-psychiatrie
MORNEX	Médecine générale

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM.	
FAVRE-GILLY	Hématologie
RIFFAT	Hygiène
ROLLET	Pharmacie galénique
BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

MM.	
BONAMOUR	Ophtalmologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
NOTTER	Gynécologie obstétricale
de MOURGUES G.	Chirurgie générale
DUMONT Martial	Obstétrique
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
DEVIC	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale
DURAND	Urologie
HUGONNIER	Ophtalmologie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
GARDE	Médecine générale
FAYSSÉ	Orthopédie
GAILLARD	Oto-Rhino-Laryngologie
PERRIN A.	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
MOUNIER-KUHN A.	Chirurgie générale
CHASSARD	Electro-radiologie
GARMIER	Obstétrique
DUMAS	Stomatologie
SCHNEPP	Orthopédie
NOEL	Médecine générale

=====

Examineurs de la Thèse =

Président : M. le Professeur R. SOHIER
.....

Assesseurs : MM. le Professeur J. THIVOLET
le Professeur L. REVOL
le Professeur J. GRAS

A MES PARENTS

En gage de ma profonde affection.

A MES PERES

A TOUS MES CAMARADES

A TOUS MES AMIS .

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. S O H I E R

Professeur de Bactériologie, Virologie et Immunologie

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Expert de l'O M S pour les maladies à virus

Il nous a fait le grand honneur de nous accepter dans son laboratoire. Il est pour nous un Maître dont nous avons pu profiter de la haute valeur de son enseignement et de ses qualités humaines et morales.

L'enthousiasme qu'il sait communiquer, la profondeur et l'étendue de ses connaissances ont affermi notre goût pour la recherche biologique.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance et notre profonde admiration.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur J. THIVOLET

Professeur d'Hygiène
Médecin des Hôpitaux

Il nous a inspiré le sujet de ce travail, pour lequel il nous a toujours guidé, ne ménageant ni son temps ni ses encouragements.

Nous avons bénéficié, pendant trois années passées auprès de lui, de son enseignement et découvert les joies de la recherche et du travail de laboratoire.

Nous le remercions vivement de sa bienveillance, de sa sympathie à notre égard et le prions d'accepter l'expression de notre respectueux attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur L. REVOL

Professeur de Pharmacie galénique

Nous le remercions de l'attention
qu'il nous a portée en acceptant de faire
partie du jury de notre thèse.

Hommage très respectueux.

Monsieur le Professeur J. GRAS

Professeur de Chimie Biologique

Il nous a fait l'honneur de s'inté-
resser à nos recherches. Nous tenons à
lui exprimer notre profonde gratitude.

Hommage respectueux.

A Monsieur le Pharmacien Commandant L. GAMOTY

qui nous a permis de poursuivre
notre travail durant notre service
militaire.

Nous sommes heureux de pouvoir
lui exprimer ici toute notre recon-
naissance.

A tout le personnel du Laboratoire d'Hygiène et du
Laboratoire de Bactériologie, Virologie

qui nous a toujours aidé dans
l'élaboration technique de ce
travail.

Très sincères remerciements.

INTRODUCTION

La technique d'Immuno-fluorescence consiste à révéler une réaction antigène-anticorps⁽¹⁾ (AG / AC) par l'intermédiaire d'un fluorochrome. Le colorant fluorescent le plus utilisé à l'heure actuelle est l'isothiocyanate de fluorescéine⁽²⁾ (F.I.T.C.).

Le procédé initial de COONS et KAPLAN (17) est la méthode d'immuno-fluorescence directe. Cette méthode requière un conjugué préparé spécialement pour chaque antigène étudié. Cette méthode dite "méthode à une couche" est surtout valable pour la recherche et l'identification des antigènes.

La méthode indirecte étudiée par WELLER et COONS (109) ou "méthode à deux couches" amène une nette simplification. Elle ne demande plus qu'un conjugué pour chaque espèce animale donnant l'antisérum. Cette méthode est mise en oeuvre soit pour l'identification des antigènes, soit pour faire un diagnostic sérologique.

(1) Lire désormais pour AG : antigène et AC : anticorps
(2) " " " FITC : isothiocyanate de fluorescéine

La fixation de l'anticorps sur l'antigène est susceptible , dans le cas de la plupart des complexes antigène-anticorps, d'être suivi de la fixation du complément, complément sérique présent et comparable dans la plupart des espèces animales.

La démonstration apportée par Mac KEE (68) de l'antigénicité du complément et la possibilité d'obtenir des anticorps anti-complément ont permis à GOLDWASSER et SHEPARD d'appliquer l'immuno-fluorescence en utilisant des sérums anti-complément conjugués avec un fluorochrome, selon le schéma indiqué dans le tableau I (4).

Nous avons étudié et essayé de mettre au point cette méthode avec divers objectifs :

Elle représente une application de l'I.F. ⁽¹⁾ intéressante par sa capacité de permettre la mise en évidence de la fixation d'anticorps sur un antigène donné quelle que soit l'espèce animale qui fournit le sérum.

Le conjugué anti-complément pourrait donc être "le révélateur universel" sans spécificité d'espèces, contrairement au conjugué anti-globuline, utilisable seulement en pratique malgré certains travaux récents (41) dans une réaction à deux couches exécutée avec un sérum de l'espèce homologue.

Elle ouvre ainsi la possibilité de confrontation intéressante avec les réactions de fixation du complément exécutées avec la technique d'hémolyse et l'on peut supposer que les anticorps révélés par cette méthode ne seront pas les mêmes que ceux décelés par les autres techniques d'immuno-fluorescence.

(1)- Lire désormais pour I.F. : immuno-fluorescence

IF DIRECTE

1° Temps	ANTIGENE autre que Gamma Globulines	+	Anticorps spécifiques anti-gamma globulines conjugué avec un fluo- rochrome	→	complexe Antigène- Anticorps fluorescent
----------	--	---	--	---	---

IF INDIRECTE

1° Temps	ANTIGENE autre que Gamma Globulines	+	Sérum total contenant gamma-globulines anti- corps	→	complexe Antigène- Anticorps
2° Temps	Complexe Antigène Anticorps	+	Anticorps contre les gamma-globulines anticorps du 1° temps marqués avec un fluo- rochrome	→	complexe Antigène- Anticorps fluorescent

IF ANTI COMPLEMENT

1° Temps	ANTIGENE autre que Gamma Globu- lines	+	Sérum total inactivé contenant Gamma glo- buline, Anticorps + C ¹ de cobaye	→	complexe Antigène- Anticorps ayant fixé le C ¹
2° Temps	Complexe Antigène- Anticorps ayant fixé le C ¹	+	Anticorps contre le complément conjugué avec un fluororo- chrome	→	complexe Antigène- Anticorps complément fluorescent

Tableau I.

De nombreux travaux, employant la méthode anti-complément, ont été réalisés avec des résultats encourageants dans le domaine de la virologie et des maladies à auto-anticorps.

L'anti-complément fluorescent est également utilisé pour démontrer la participation du complément au niveau des tissus malades, notamment dans certaines affections rénales (11)(53)(54)(55)(56). KLEIN et BURKHOLDER ont montré que l'anticorps anti-complément de cobaye marqué à la fluoréscéine permettait la mise en évidence du complément fixé "in vitro" sur des biopsies de reins chez des sujets atteints de glomérulonéphrites membraneuses.

Par la même méthode VCGT et KOCHER (108) montrèrent la présence de complément lié dans l'amyloïdose. STRAUSS et ses collaborateurs (104) appliquèrent la méthode de KLEIN et BURKHOLDER à des biopsies de muscles de malades atteints de myasthénie grave.

Avec l'emploi de sérum anti-complément fluorescent, KLEIN et BURKHOLDER démontrèrent la fixation du complément "in vivo" dans les néphrites expérimentales chez le rat. Puis, LACHMAN, en 1962, en utilisant un sérum anti-bêta 1C (anti C'3) fluorescent, montre que le C' se fixe sur les tissus humains, notamment dans les glomérulo-néphrites et les maladies à auto-anticorps comme le lupus-érythémateux.

Nous avons essayé de mettre au point cette méthode qui nous permettrait d'avoir un outil de travail dans la recherche bactériologique et virologique.

Dans ce travail, nous envisagerons successivement :

- Une première partie : traitant de la technique d'Immuno -fluorescence utilisant les sérums anti-complément de cobaye. Cette première partie est subdivisée en quatre chapitres :
 - Rappel sur le complément
 - Les techniques de production d'anti-sérums
 - Titrage des immuns sérums
 - Marquage des conjugués
 - Purification des conjugués.

• Une deuxième partie : traitant de l'utilisation pratique des conjugués anti-complément .

- Dans la recherche des auto-anticorps antinucléaires
- Dans la recherche des auto-anticorps antitreponémiques
- Dans la recherche virologique.

— — — — —

P R E M I E R E P A R T I E

T E C H N I Q U E D ' I M M U N O - F L U O R E S C E N C E

U T I L I S A N T L E S S E R U M S A N T I - C O M P L E M E N T D E C O B A Y E

CHAPITRE I

RAPPEL SUR LE COMPLEMENT

Le complément (C')⁽¹⁾ est défini par MULLER- EBERHARD comme un système complexe de facteurs macromoléculaires sériques, qui réagissent en une séquence déterminée avec le complexe AG/AC, en formant une suite de complexes intermédiaires jusqu'à l'obtention d'un complexe final prêt à subir l'immuno-hémolyse.

Le complément (BORDET) ou alexine (BUCHNER) est une substance thermolabile incapable de se fixer seule au niveau des hématies de moutons mais provoque leur hémolyse si ces hématies ont au préalable fixé une hémolytine appelée sensibilisine ou anbrocepteur.

Nous allons rappeler successivement la nature complexe du complément et son rôle en Immunologie.

I - NATURE ET STRUCTURE DU COMPLEMENT

A - Fractionnement du complément

Le complément était considéré au début comme une substance unique. En 1907, FERRATA, en dialysant le complément contre de l'eau distillée, a séparé deux fractions qui, prises isolément, sont inactives.

(1) - Lire désormais pour C' : Complément.

- Une fraction insoluble dans l'eau distillée, de nature euglobulinique : c'est le chaînon moyen.

- Une fraction soluble dans l'eau distillée de nature pseudoglobulinique : c'est le chaînon terminal.

Actuellement on donne au complément une structure avec quatre composants qui possèdent eux-mêmes des sous-unités. Les quatre composants sont de nature chimique différente que l'on désigne par les symboles C'1 - C'2 - C'3 - C'4 . (Le complément total étant désigné par le symbole C').

Le tableau II résume les méthodes de fractionnement de ces composants.

B - Propriétés physico-chimiques du complément

La fraction C'1 est isolée du sérum de cobaye par fractionnement des euglobulines à l'aide de sulfate d'ammonium. On peut également obtenir la fraction C'1 sous une forme très pure par dissociation du complexe qu'il forme avec des globules rouges sensibilisés.

La fraction C'2, obtenue sous forme de fraction purifiée en précipitant le sérum humain par une solution de sulfate d'ammonium, est une globuline.

La fraction C'3 est de composition lipoprotéique. Elle est obtenue par précipitation avec le Rivanol (103).

Au cours des réactions de précipitation la fraction C'4 est d'une façon stable associée au C'2. Le composant C'4 (bêta 1E) a été dissocié du C'2 (bêta 1C) par isolement sur des globules rouges sensibilisés (79).

II - ROLE DU COMPLEMENT EN IMMUNOLOGIE

Le complément intervient dans d'importants phénomènes d'immunologie, mais nous nous bornerons à étudier plus particulièrement la fixation du complément et son action lytique sur des globules rouges sensibilisés.

Complément total

C ₁ C ₂ C ₃ C ₄					
				PO ₄ H ₂ K M/200 pH 5,4 - μ 0,02	Précipité ——— M
					Surrogateant ——— E
				Chauffage 20 mn - 56°	————— H
				Action Zymosan 37°	————— Z
				Action NH ₄ OH	————— N

TABLEAU II d'après AUDRAN (2)

Méthodes de fractionnement des composants du complément

Complément total

C ₁ C ₂ C ₃ C ₄					
				Dilution PO ₄ H ₂ K 0,02 M - pH 5,4	R ₁
				56° - 20 mn	R ₂
				Action Zymosan 37°	R ₃
				Action NH ₄ OH 0,15 M	R ₄

TABLEAU III d'après AUDRAN (2)

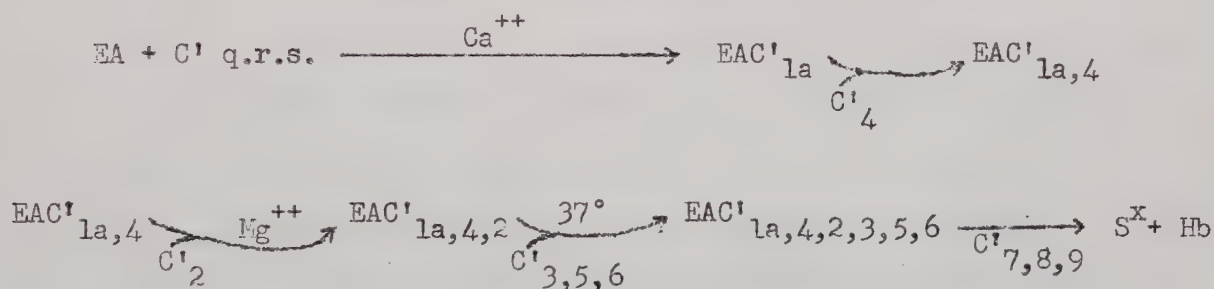
Méthodes de préparation des réactifs R₁, R₂, R₃, R₄

A - La fixation du complément

Le complément possède la propriété de se fixer sur un système antigène-anticorps. Il devient alors inutilisable pour l'hémolyse des globules rouges sensibilisés. Ce principe est utilisé dans les réactions immunologiques de fixation du C'. Dans la fixation interviennent les composants C'1, C'2, C'4. Le C'3 n'intervient qu'ultérieurement pour provoquer le phénomène de lyse. La fixation est plus rapide à 37°C qu'à 0°C, en présence d'ions Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , à pH voisin de la neutralité.

B - Action lytique du complément

Le processus de l'hémolyse a été divisé en étapes nettement séparées. Après la combinaison des Erythrocytes (E) avec l'anticorps sensibilisant (A) pour former (EA) il se produit les étapes suivantes :



D'après : le Symposium sur le Complément (CIBA)

MAYER et LEVINE ont montré que le Ca^{++} n'intervient que dans le premier stade et que le Mg^{++} dans le deuxième stade de la réaction. Le troisième stade où intervient C'3 comporterait plusieurs phases avant la lyse des Erythrocytes. L'action rapide du complément à 37°C évoque une action enzymatique. LEPCOW (62) et BECKER (3) ont conclu que la transformation de C'1 sur le système AG/AC résulte de la conversion de C'1, pro-estérase en estérase. La réaction qui a lieu est symbolisée par EA C'1. Cet intermédiaire qui fut isolé et codifié par HAINES et

LEPOW (38) peut être inhibé par le di-isopropyl-fluorophosphate (D.I.F.P.). D'autre part, les travaux de MULLER-EBERHARD (77) (78) (79) (80) ont permis de subdiviser C'₃ en 5 facteurs distincts qui se fixent sur le substrat par différentes actions enzymatiques et qui conduisent à la lyse des globules rouges (14)(63).

III - ROLE DES COMPOSANTS DU COMPLEMENT DANS LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE

La fixation du C' sur les globules rouges sensibilisés se réalise en une série d'étapes dont il est possible de produire individuellement les différents complexes intermédiaires avant d'aboutir à l'hémolyse (57) (58). Chaque sensibilisation est faite avec un ou plusieurs composants du C'.

Pour déterminer l'ordre dans lequel interviennent les composants C'₁, C'₂, C'₃, C'₄, responsables de l'immuno-hémolyse, le complément est fractionné, suivant la méthode de KABAT et MAYER (50).

- R₁ : complément sans C'₁ obtenu par dilution de complément dans un tampon phosphate de force ionique 0,02 et à pH 5,2.
- R₂ : complément sans C'₂ par chauffage à 56° pendant 30 mn.
- R₃ : complément sans C'₃ par traitement par le zymosan.
- R₄ : complément sans C'₄ par traitement avec NH⁴OH 0,15 M.

En employant les réactifs R₁, R₂, R₃, R₄, GOLDWASSER et SHEPARD (31) ont pu montrer que C'₁, C'₂ et C'₄ devaient être présents simultanément pour que la réaction d'immuno-fluorescence anti-complément ait lieu complètement.

KLEIN et BURKHOLDER (58) montre que les globules rouges sensibilisés et exposés au complément actif, se trouvant donc sous la forme EA C'₁, C'₄, C'₂ sont agglutinés par les sérums anti-C'. Donc, dans cette réaction, le composant C'₃ n'intervient pas. HARBOE et MULLER-EBERHARD (40) (79) ont iden-

tifié le C'4 à la bêta 1 E globuline et une fraction du C'3 sensible à l'hydrazine à la bêta 1 C globuline. La bêta 1 C globuline peut être obtenue pure (103) elle nous a permis d'obtenir un sérum anti-bêta 1 C associé à des anti-gamma globulines.

CHAPITRE II

- - -

PREPARATION DES SERUMS ANTI-COMPLEMENT

Depuis plus de soixante ans, de nombreux travaux ont été entrepris pour démontrer l'antigénicité du complément.

Deux principales méthodes ont été principalement employées pour produire un immun sérum contre le complément.

- La première méthode consiste à immuniser des animaux avec du sérum frais et actif de cobaye (21) (82) ou avec certaines fractions (32) (42) (43).
- L'autre méthode employée est celle où le complément est fixé sur un substrat AG/AC (5) (22) (58) (88).

Nous avons donc la possibilité de préparer divers sérums anti-complément qui pourront être employés à diverses fins.

- . Anti sérum de cobaye complet.
- . Anti gamma globulines globales de cobaye.
- . Anti fraction obtenu chimiquement : C'_3 .
- . Anti complément purifié (c'est-à-dire fixé sur un complexe AG/AC).

La production de ces anti-sérums par ces différents procédés dépend donc :

- de l'antigène utilisé
- du schéma immunisation.

Les lapins reçoivent par voie intraveineuse, tous les quatre jours 2 ml de sérum de cobaye frais (82). Dix jours après la cinquième injection, ils sont saignés à la veine marginale de l'oreille. Le sérum est précipité par le $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ pour obtenir les gamma-globulines immunes. Celles-ci sont titrées contre du C¹ frais de cobaye pour connaître leur pouvoir anti-complément.

II - IMMUNISATION SELON LA TECHNIQUE DE HINUMA ET HUMMELER

Les gamma-globulines de sérum frais de cobaye sont précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation selon la méthode de KENDALL décrite par COONS (17). Les gamma-globulines sont purifiées par une nouvelle précipitation saline puis dialysées et titrées en protéines.

Nous immunisons trois lapins mâles de 4 kg. Chaque lapin reçoit en injection intraveineuse, 4 fois par semaine pendant 3 semaines, une solution à 2% de gamma-globuline (43).

La première semaine il reçoit 0,4 ml de globuline pour chaque injection. La deuxième on lui injecte 0,2 ml et la dernière 0,5 ml. Les animaux sont saignés 4 jours après la dernière injection. Les sérums sont titrés pour leur pouvoir anti-complément, après avoir obtenu les gamma-globulines anti-complément par précipitation au sulfate d'ammonium au tiers de saturation.

III - IMMUNISATION SELON LA TECHNIQUE DE HINUMA - OHTA modifiée

Selon la technique de HINUMA et OHTA (44) le sérum anti-complément est obtenu en immunisant des lapins avec des gamma-globulines de cobaye précipitées par le sulfate d'ammonium et une fraction globulinique obtenue par électrophorèse sur gel d'amidon, correspondant à la bêta 1 C globuline.

L'obtention des fractions que nous avons employées pour l'immunisation est différente de celle utilisée par HINUMA et OHTA.

Nous avons employé deux fractions de complément. La première est une solution de gamma-globuline de sérum frais de cobaye obtenue par

précipitation avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation. La fraction bêta 1 C globuline qui représente le composant C'3 du complément est obtenu par précipitation avec le Rivanol.

Comme l'a montré MULLER-EBERHARD le C'3 est un composant du complément se fixant sur le complexe SAC'1,4,2a. Il donne un nouvel intermédiaire stable SAC'1, 4, 2, 3, 5, 6. Le C'3 représente la bêta 1 C globuline, le C'5 représente la bêta 1 F globuline. LINSKOTT et NISHIOKA (64) séparent deux autres composants le C'3a et le C'3b (C'7, C'8) qui transforme SAC'1, 4, 2a, 3, 5, 6 en S^X.

1° - Obtention de la Fraction bêta 1 C globuline

La bêta 1 C globuline est obtenue par précipitation avec le Rivanol (6,8 di-amino-2 éthoxy acridine) (103). Le sérum frais de cobaye mâle est absorbé par de la bentonite à 2%. La bentonite permet d'absorber les bêta lipo-protéines du sérum. Le surnageant est ajusté à pH 6,3, puis il est additionné de Rivanol à 0,5% préparé dans du tampon phosphate à pH 7,0. On utilise 0,5 volume de Rivanol par volume de surnageant.

Le précipité obtenu après 30 mn d'agitation et une heure de repos à +4°C, est lavé avec une solution de Rivanol à 0,05%. Le précipité est redissous dans 1/5^è du volume initial dans une solution de NaCl à 3%. Le pH doit être surveillé et ne doit pas dépasser pH 8,0. Le surnageant dialyse à +4°C pendant une nuit contre du tampon acétate⁽¹⁾ 0,01 M à pH 5,3. Le précipité obtenu dans le boyau de dialyse est centrifugé à +4° puis lavé et redissous dans de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,0.

2° - Immunisation des animaux

Les deux fractions ainsi obtenues sont lyophilisées. Lors de leur emploi elles sont dissoutes pour obtenir une solution à 1,5% en protéine. On injecte aux lapins chaque antigène avec de l'adjuvant. (Bayol F - Arlacel C dans le rapport 9 parties pour une partie), en injection sous-cutanée et intra-

(1) - Tampon acétate : 42 ml Ac. acétique 0,01 M
158 ml Acétate de Na 0,01 M

musculaire. Chaque animal reçoit 30 mg de protéine de chaque antigène, chaque semaine. Il reçoit ainsi 3 doses successives, puis ils sont saignés une semaine après la dernière injection.

3° - Fractionnement de l'immun-sérum

Les sérums anti-gamma globuline et anti-bêta 1 C globuline de cobaye sont fractionnés sur D.E.A.E. cellulose ⁽¹⁾ pour obtenir les gamma-globulines anti-complément.

Nous avons utilisé la méthode de STANWORTH (99). La D.E.A.E. cellulose absorbe les non-gamma globulines du sérum et par élution avec des liquides tampons appropriés nous obtenons différentes fractions sériques.

a) Préparation de la D.E.A.E. cellulose

On prend 1 gramme de D.E.A.E. cellulose pour un millilitre de sérum, ce qui correspond à 8 fois le poids en D.E.A.E. cellulose régénérée humide. On retire au maximum l'eau par aspiration. On additionne 10 volumes de tampon phosphate pH 7,2, en plusieurs fois, pour équilibrer l'échangeur d'anion. Par la suite on met la D.E.A.E. cellulose humide dans un bécher et l'on additionne un volume de tampon.

b) Obtention des gamma-globulines

On dialyse un volume d'anti-sérum pendant 8 à 16 heures contre 100 volumes de solution saline tamponnée à pH 7,2. En agitant continuellement, on ajoute goutte à goutte l'anti-sérum dialysé à la suspension de cellulose. On laisse reposer 5 heures. Après équilibre avec le sérum on additionne 2 volumes de tampon en remuant. On filtre la suspension par aspiration sur Büchner. On obtient la fraction I ; cette fraction contient les gamma-globulines à un titre haut de pureté. On obtient une fraction II en lavant la cellulose avec un nouveau volume de tampon phosphate. On concentre les deux fractions contre du Poly-éthylène glycol 20 000, puis contre une solution saline tamponnée à pH 7,2.

(1) - Lire pour D.E.A.E. cellulose : di-éthylaminoéthyl cellulose.

IV - IMMUNISATION SELON LA TECHNIQUE DE BEUTNER

1° - Etude de la formation du complexe EAC'

Mac KEE (68) a préparé des anticorps anti-C' de cobaye en immunisant des lapins par du complément de diverses espèces animales fixé sur un précipité spécifique AG/AC.

Pour étudier la réaction d'hémolyse par le complément, MAYER (71) prit le système AG/AC fait par des globules rouges de mouton (E), l'anti-sérum sensibilisant (A) et du sérum frais de cobaye source de complément (C').

La surface des globules rouges (E) contient des sites antigéniques (S) capables de fixer l'anticorps (A) correspondant. Un globule rouge ayant un ou plusieurs sites se combinant avec (A) donne (EA) s'il y a un site individuel, MAYER le désigne par (SA) (71).

L'interaction de (SA) et des composants du complément C'1, C'4, C'2, C'3, dans cet ordre, donne un site désigné par S*. Un globule rouge contenant plusieurs S* est désigné par E*. UENO donne les trois stades de la fixation du C' dans les réactions intermédiaires et les désigne par "globules rouges sensibilisés" qui correspondent à EA C'1 - "super sensibilisés" à EA C'1, a, 4 - et hypersensibilisés à EA C'1, a, 4, 2a -

MAYER et LEVINE en 1954 (72) préparaient E* en exposant EA au complément en présence de Ca^{++} et Mg^{++} à 37° pendant 4 mn. Le processus lytique était arrêté par refroidissement de la suspension, puis on séparait les cellules intactes par centrifugation. KLEIN et BURKHOLDER (57) (58) préparèrent des stromas sensibilisés fixant le complément, et des fractions de C', et obtinrent des sérums immuns.

2° - Technique de BEUTNER

a) Préparation de l'antigène

Les globules rouges sont mis en suspension dans 99 volumes de solution diluante tamponnée pH 7,2, contenant les Ions Mg^{++} Ca^{++} (5).

On ajoute le sérum hémolytique titrant 8 000 unités hémolytiques, dans le rapport 0,33 volume (le titrage du sérum hémolytique se faisant en utilisant le C₅₀ au 1/15) pour un ml de globules rouges. L'incubation se fait pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sensibilisées sont lavées 5 fois avec la solution tampon.⁽¹⁾ Elles sont remises en suspension dans 300 volumes de solution diluante tamponnée, que l'on place à +4°. On ajoute 2 volumes de complément frais de cobaye. Après une incubation de 18 heures à +4° et de 2 heures à 37°, les stromas des globules rouges lysés sont récupérés par centrifugation à +4° dans un tube conique, à 12 800 g. pendant 10 mn. On lave le précipité jusqu'à ce qu'il soit clair. Les globules rouges sensibilisés ayant fixé le complément servent d'antigène.

b) Immunisation des animaux

Les lapins reçoivent 3 injections à une semaine d'intervalle et une injection de rappel 2 semaines après. Les injections sont faites en sous-cutanée et intramusculaire. Pour cette immunisation nous avons utilisé l'adjuvant complet de FREUND. L'utilité de l'adjuvant de ce type où l'antigène est incorporé dans la phase aqueuse d'une émulsion eau-huile et dont la phase huileuse contient des myco-bactéries tuées et parfaitement établies (27)(110)(111). Les myco-bactéries jouent un rôle dans la sensibilisation tandis que l'émulsion eau-huile augmente la formation des anticorps et la prolonge.

Le mélange se prépare selon la technique de BOYD (6). Deux parts d'antigène sont mélangées avec une part de Falba⁽²⁾. Le mélange est homogénéisé avec deux parts de Bayol F⁽³⁾ contenant 1 mg par ml de myco-bactérium tuberculosis tués, séchés, souche Jamaica.

(1)	Solution diluante: Formule	NaCl..... 0,115 M
		PO ₄ KH ₂ 0,012 M
		PO ₄ Na ₂ H... 0,012 M
		MgCl ₂ 0,001 M
		CaCl ₂ 0,003 M

(2) Falba: dérivé de la lanoline.

(3) Bayol F : huile de paraffine légère.

Ici chaque injection contient 0,7 ml d'antigène associé avec l'adjuvant. Nous avons fait une prise de sang à l'oreille du lapin 7 à 8 jours après la dernière injection pour titrer le pouvoir anti-complément du sérum.

3° - Technique de BEUTNER modifiée

Nous avons fait une immunisation avec un schéma un peu différent de celui de BEUTNER car l'immunisation nous a semblée pas assez élevée et pas assez forte.

Les lapins reçoivent la première semaine 3 injections intraveineuses dans la veine marginale de l'oreille à 3 jours d'intervalle. Pour éviter une mort de l'animal par choc anaphylactique on injecte en intra-péritonéale une demi-heure avant l'injection, une solution d'anti-histaminique. Par la suite, nous reprenons le schéma précédent d'immunisation de BEUTNER (schéma I)

Ces sérums anti-complément doivent être absorbés car ils possèdent des anticorps vis-à-vis des globules rouges et des globules rouges sensibilisés injectés avec l'antigène. Nous absorbons donc les sérums deux fois pendant 2 heures à 37° et une fois 16 heures à +4° avec 1/10 du volume de cellules sensibilisées. Après ce traitement le sérum est titré pour son pouvoir anti-complément. On peut également éviter cette production d'anticorps contre les globules rougessensibilisés en utilisant pour chaque injections différents substrats AG/AC fixant le complément.

Des anticorps vis-à-vis de C'1, C'4 et de C'3 peuvent être produits par inoculation de globules rouges sensibilisés ayant fixé le composant correspondant contenu dans le sérum frais de cobaye. L'anti-C'4 et l'anti-C'3 (78) ainsi préparés peuvent être détectés par des tests d'agglutination avec des globules rouges appropriés (40). L'anti-C'3 et C'4 sont utilisés en hématologie et dans l'étude de la participation du complément dans les tissus (61).

Nous avons récapitulé dans le Schéma II les 5 techniques d'immunisation que nous avons utilisées. Nous avons indiqué le temps d'immunisation, le mode d'inoculation de l'AG et le temps de repos qu'il faut après la dernière injection, avant de pouvoir tester en pouvoir anti-complément les immun-sérums.

IMMUNISATION		IMMUNISATION		
"BEUTNER"		"modifiée"		
1 ^e Sem.	0	← IM 0,7 ml AG	0	← IV 3ml AG
	7	← IM 0,7 ml AG	3	← IV 1,5 ml AG
2 ^e Sem.	14	← IM 0,7 ml AG	6	← IV 0,7 ml AG
	21	Repos	14	← IM 0,7 ml AG
3 ^e Sem.	28	← Rappel IM 0,7 ml AG	21	← IM 0,7 ml AG
	35	← P.S.	28	← IM 1,5 ml AG
4 ^e Sem.			35	Repos
			42	← Rappel IM 1,5 ml AG
5 ^e Sem.			49	← P.S.
6 ^e Sem.				
7 ^e Sem.				

Schéma n°1 : Comparaison d'immunisation par la méthode de BEUTNER et par la méthode de BEUTNER "modifiée".

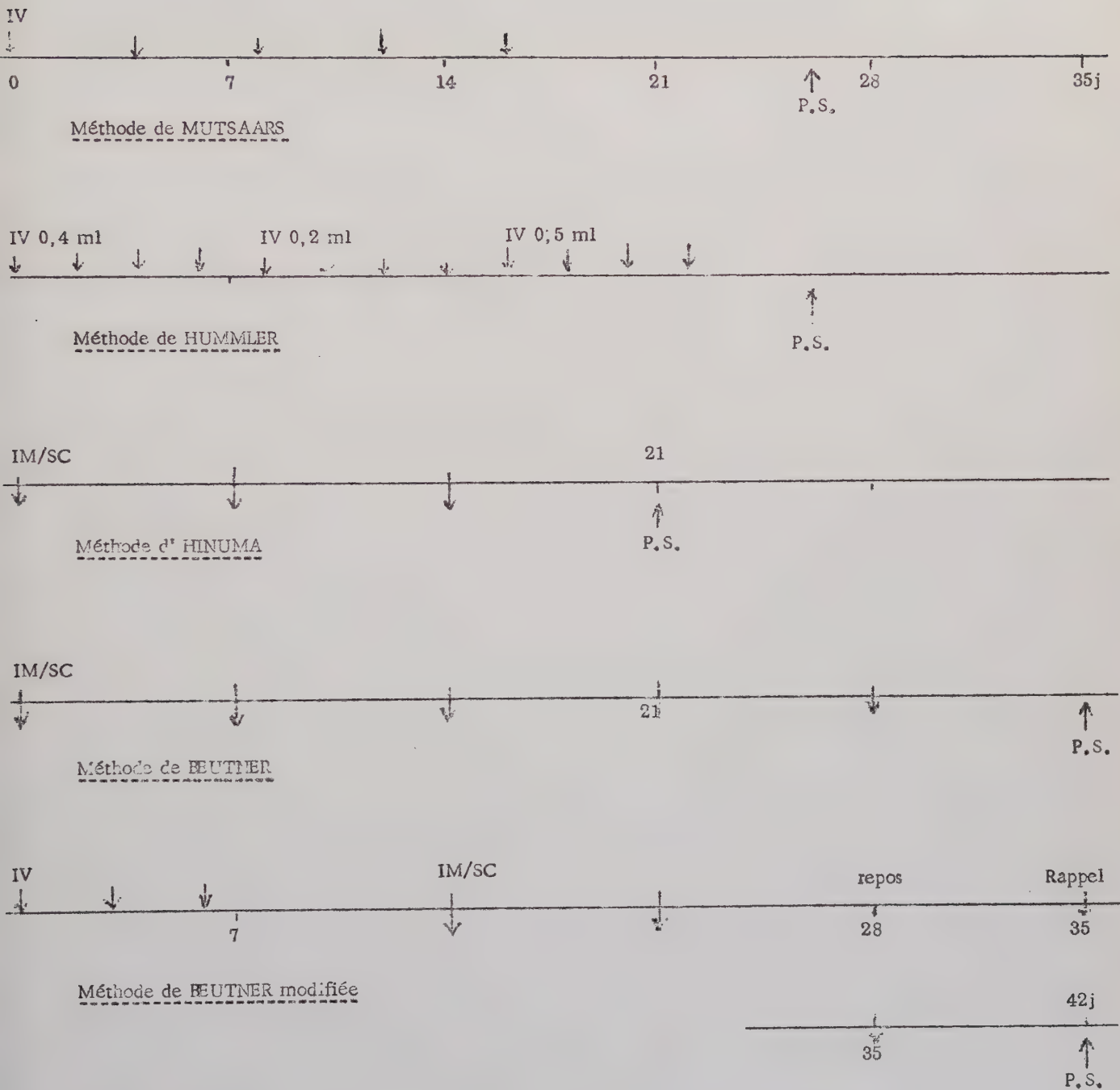


Schéma n°II : Immunisation de lapins mâles de 3 kg selon les différentes méthodes décrites.

C'est ce que nous allons voir maintenant dans le chapitre suivant, car le titre des sérums anti-C¹ est un des facteurs les plus importants qui conditionne l'intensité de la fluorescence obtenue.

— — — — —

CHAPITRE III

TITRAGE PREALABLE DES ANTI-SERUMS

Il est important d'évaluer les anti-sérums produits en les titrant avant de les conjuguer au fluorochrome. Pourtant, il est certain que la réussite de l'immunisation ne pourra être vraiment appréciée que lorsque les divers conjugués auront été engagés dans des réactions d'immuno-fluorescence selon la technique "anti-complément". Mais le titrage préalable apporte des renseignements indispensables qui permettent en particulier :

- de comparer les diverses méthodes d'immunisation
- de suivre l'immunisation d'un animal et de préciser le moment optimum pour la collecte du sérum.
- d'établir une corrélation suffisante entre le titrage préalable et l'efficacité du conjugué dans la réaction d'immuno-fluorescence.

En effet, il est indispensable de savoir à partir de quel titre un sérum sera ou non utilisable et pourra donc être "conjugué".

Dans la mesure où l'antigène utilisé pour la production des anti-sérums n'est pas absolument purifié, les anticorps formés au cours de l'immunisation représentent une population plus ou moins hétérogène dont les diverses fractions correspondent, dans des proportions à priori mal prévisibles, non seulement à l'antigène principal mais aussi aux impuretés.

Les méthodes de titrage doivent donc comporter :

- des procédés qualitatifs qui permettent d'apprécier la signification antigénique des anticorps contenus dans les sérums. C'est le cas de l'analyse immuno-électrophorétique. On obtient ainsi une appréciation sur la spécificité des immun-sérums.

- des procédés quantitatifs qui apprécient la dernière dilution de l'immun-sérum susceptible de réagir en présence d'une certaine quantité d'antigène.

Nous envisageront successivement ces deux types de titrage - qualitatif et quantitatif - et nous établirons les corrélations entre les titres des anti-sérums évalués par les procédés quantitatifs et les résultats obtenus lorsque ces anti-sérums conjugués ont été engagés dans des réactions d'immuno-fluorescence anti-complément en anticipant sur l'exposé de ces résultats.

I - METHODE IMMUNOLOGIQUE QUALITATIVE

A - L'immuno-électrophorèse

L'immuno-électrophorèse, qui combine à la fois l'électrophorèse sur gélose et l'immuno-chimie (GRABAR) consiste à déposer parallèlement à l'électrophorèse un immun-sérum. On obtient un précipité en face des fractions correspondantes, permettant de distinguer plusieurs sous-fractions (97).

L'immuno-électrophorèse nous a permis de révéler les fractions antigéniques pour les différentes immunisations envisagées. Avec la méthode d'HINUMA, l'immuno-électrophorèse nous a donné deux arcs de précipitation vis-à-vis du C'. Ces deux arcs ont pu être identifiés à des anti-gamma globulines et des anti- β_2 globulines de coabaye.

L'immun-sérum obtenu par la méthode de BEUTNER mise en contact avec le complément, donne trois lignes de précipitation qui ne furent pas toutes identifiées : l'une représentant la ligne des anti-gamma globulines.

Les deux autres traits de précipitation sont situés dans les α_2 - et β -globulines.

Nous retrouvons ici les mêmes arcs de précipitation que STATTON (100) a obtenu en immunisant des lapins avec des stromas de globules rouges ayant fixé le C¹.

Avec certains lapins, l'immunisation est plus poussée et l'immun-sérum donne 5 arcs de précipitation que l'on retrouve dans les α , β et γ -globulines.

La valeur des anti-sérums produits dépend de la nature des antigènes utilisés, de la voie d'introduction, du nombre d'injections, mais également interviennent l'âge, le sexe et la susceptibilité à réagir de l'animal.

Ainsi, nous avons des variations dans les titres des anti-sérums produits par plusieurs animaux, selon une même technique d'immunisation.

II - METHODE IMMUNOLOGIQUE QUANTITATIVE

=====

L'immunisation des animaux amène la production d'anticorps de différents types tels que les agglutinines, les précipitines, les lysines, mises en évidence par des réactions immunologiques appropriées.

La réaction AG/AC peut se manifester soit par une réaction de précipitation, soit par une réaction d'agglutination ou par une réaction de fixation du C¹.

Ainsi, avec la méthode du "test de l'anneau" à anticorps constants en milieu liquide (93) et la méthode d'immuno-diffusion en gélose (86) nous avons formation d'un précipité entre la protéine à étudier et l'immun-sérum correspondant.

Les deux méthodes :

- test de l'anneau à anticorps constants
- Immuno-diffusion en plaques de gélose

permettent de déterminer le taux d'azote des anti-sérums. Mais elles ne peuvent être utilisées qu'à titre comparatif.

L'autre série de méthodes que nous avons utilisée permet de déterminer le titre du pouvoir anti-complément des sérums obtenus

- hémagglutination conditionnée ou passive
- fixation du complément.

A - Test de l'anneau à anticorps constants.

1°) Technique

Le test de l'anneau permet une détection rapide de tout antigène soluble ou anticorps précipitant. Dans la réaction, l'antigène est toujours placé au-dessus de l'anticorps. A l'inter-face des deux liquides, il se forme un anneau de précipitation qui permettra de juger de la valeur antigénique de l'immun-sérum.

2°) Réaction

Dans de fins tubes (4x40 mm) on introduit à la pipette Pasteur l'anti-sérum jusqu'à 5 mm de haut sans en faire couler le long des parois du tube. Une quantité équivalente de solution antigénique est introduite de la même manière, sans que se fasse le mélange antigène-anticorps. Au bout de 2 heures, à la température du laboratoire, on lie l'anneau de précipitation en le notant en croix. Après 24 heures, à la température ordinaire, on fait une deuxième lecture du précipité qui a sédimenté au fond des tubes. On tient compte seulement de cette dernière lecture pour apprécier la valeur de l'anti-sérum. L'antigène utilisé est, soit des gamma-globulines de cobaye précipitées au sulfate d'ammonium contenant 10 mg de protéines par millilitre, soit du complément frais de cobaye titrant 2 unités. Les dilutions de l'antigène sont faites en eau physiologique tamponnée pH 7,2 (tableau IV).

3°) Résultats

Le test de l'anneau à anticorps constants a été fait pour chaque méthode d'immunisation. L'anti-sérum obtenu a été mis en contact avec l'antigène utilisé pour préparer l'immun-sérum (tableau V).

Tableau IV

Tubes	1	2	3	4	5	6	Témoins
Antigène	0,1] → 0,1] → 0,1] → 0,1] → 0,5] → 0,5						
H ₂ O physiol.	0,9] 0,9] 0,9] 0,9] 0,5] 0,5						
Dilution	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 5.10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵						
Ag	Ag 0,5 ml						Ag H ₂ O
Ac	Ac 0,5 ml						H ₂ O Ac
Précipitation	+	+++	+++	+++	++	+	- - -

Technique de dilutions de l'antigène par le
test de l'anneau à AC constants

Tableau V

Méthode	Antigène	Titre
MUTSAARS	C ⁺ cobaye	10 - 3 ++
HUNELER	IgG cobaye	10 - 3 ++
HINUMA	IgG cobaye	10 - 3 +++
BEUTNER	C ⁺ cobaye	10 - 4 ++
BEUTNER modifié	C ⁺ cobaye	10 - 4 +++

Titration des immun-sérums par la méthode du
test de l'anneau à AC constants

B - Immuno-diffusion en plaques de gélose

Nous avons utilisé la méthode d' OUCHTERLONY (86). L'antigène et l'anticorps sont présents et migrent dans la gélose. Les lignes de précipitation apparaissent quand il y a une concentration optimale de l'antigène et de l'anticorps. Le nombre d'arc de précipitation indique le nombre de systèmes antigène-anticorps présents. Mais un système antigène-anticorps peut donner de multiples lignes de précipitation dues aux différentes fractions de poids moléculaires différents. (Immuno-globulines 19 S et 7 S). Les réactions non spécifiques sont contrôlées avec des sérums de lapins non immunisés.

1°) Préparation des plaques

La gélose (Difco) est préparée à 1%. Un gramme d'agar-agar est pesé puis dissous dans du tampon salin phosphaté à pH 7,8, au bain-marie bouillant. Lorsque la solution de gélose est prête, on la coule dans un récipient rectangulaire contenant dans le fond une lame porte-objet. On laisse solidifier la gélose, puis on la découpe suivant le contour de la lame. Avec un emporte-pièce (pipette Pasteur calibrée de 1 mm de diamètre) on fait 5 puits autour d'un puits central à une distance de 7 mm.

2°) Réaction

Dans le puits central on met l'anti-sérum dilué au 1/10, puis, autour, on met les dilutions de l'antigène : 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 5.10⁻⁴. Le dernier puits sert de témoin avec un sérum de lapin non immunisé.

Les lames sont mises dans des boîtes de Pétri où une humidité suffisante est maintenue en mettant du papier-filtre imbibé d'eau physiologique. La réaction peut être laissée à la température ordinaire. Elle se développe plus lentement qu'à 37°. Au bout de 48 heures, les précipités apparaissent. On lave les lames avec de l'eau saline, puis on sèche la gélose à l'étuve en mettant du papier-filtre sur la gélose pour absorber l'eau et les sels. On obtient un film de gélose que l'on colore en Vert lumière, pour révéler les arcs de précipitation.

3°) Résultats

La lecture de la réaction se fait après la coloration des précipités par le vert lumière car le plus souvent nous avons apparition de nouveaux arcs de précipitation. Le titre de la réaction est déterminé par la dernière dilution qui donne une précipitation complète. (Tableau VI).

Tableau VI

Méthode	Antigène	Titre	Précipitation
MUTSAARS	C' cobaye	10 - 3	2 arcs
HUMELER	IgG cobaye	10 - 4	1 arc
HINUMA	IgG cobaye	10 - 4	1 arc
	bêta IC	10 - 2	1 arc
BEUTNER	C' cobaye	5.10 - 4	3 arcs
BEUTNER (modifié)	C' cobaye	5.10 - 4	3 arcs

Titration des Immun-sérums par l'immuno-diffusion en plaques de gélose.

Dans la méthode de MUTSAARS nous avons deux lignes de précipitation, dont l'une a été identifiée à des anti-gamma globulines de cobaye par rapport au témoin gamma-globuline de cobaye mis dans un des puits.

Dans la méthode de HUMELER nous avons un seul précipité avec les gamma-globulines de cobaye ou avec le C' de cobaye mis dans un puits témoin.

Avec l'immun-sérum obtenu par la méthode d'HINUMA nous avons une précipitation avec les gamma et bêta₁C globulines de cobaye que nous retrouvons lorsque nous mettons du C' de cobaye comme antigène.

Par contre, avec la méthode de BEUTNER et la méthode de BEUTNER modifiée, la précipitation de l'immun-sérum contre du complément frais de cobaye, nous donne trois lignes de précipitation dont deux fusionnent et interfèrent complètement avec les gamma et bêta globulines témoins. Avec le complément inactif on obtient aucune ligne de précipitation.

C - Hémagglutination passive ou conditionnée

BOYDEN (7) décrivait, en 1959, pour la première fois, la conjugaison de différentes protéines avec des Erythrocytes traités par l'acide tannique, et l'agglutination de ces protéines conjuguées avec ces globules rouges par le sérum anti-protéine correspondant.

Nous avons employé la méthode de BOYDEN en utilisant une solution d'acide tannique au 1/20 000 pour traiter les globules rouges. Nous avons dans ce cas des témoins globules rouges qui agglutinent spontanément. Nous avons utilisé des concentrations en acide tannique (Merck) plus faibles allant du 1/60 000 au 1/100 000 suivant les globules rouges employés. Avec ces titres là on élimine l'agglutination spontanée.

Les meilleurs résultats et les plus reproductibles nous ont été donnés par la méthode d'hémagglutination passive à la Benzidine-Bis-Diazote⁽¹⁾ (B.D.B.)(Merck).

La technique par le couplage des protéines avec les globules rouges, par l'intermédiaire du B.D.B., fut décrite initialement par PRESSMAN, CAMPBELL et PAULING (92). Puis STAVITSKY (101) (102) employa la méthode pour la détection des anticorps et des antigènes par hémagglutination.

1°) Technique de préparation de la benzidine-bis-diazote

On fait une réaction de diazotation à 0°C. Dans un vase de Dewar avec une solution de benzidine dans l'acide chlorhydrique.

Benzidine	0,25 g
HCl 0,2 M	45 ml

et une solution de nitrite de sodium dans l'eau distillée.

Nitrite de sodium	0,175 g
H ₂ O	5 ml

On mélange la solution nitrique à la benzidine. On agite 15 mn et l'on obtient une solution jaune clair. La benzidine-bis-diazoté est congelée à moins 70°C immédiatement, puis est conservée à moins 20°C en tubes maigres.

(1) - Lire désormais pour B.D.B. : Benzidine-Bis-Diazoté.

2°) Matériel

- Eau physiologique tamponnée à pH 7,2.

- Eau physiologique tamponnée à pH 7,2 additionnée d'albumine bovine (fraction V) à 2 p. 1000. Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums et la solution finale d'hématies sensibilisées.

- Hématies de mouton ou humaine O Rh+ ou Rh-.

Le sang est prélevé sur une solution d'Alsever ⁽¹⁾ dans la proportion de 1p/1p. Cette dilution de sang rendue incoagulable peut être conservée à +4° pendant une semaine. Avant l'emploi, les globules rouges sont lavés trois fois en eau physiologique tamponnée à pH 7,2.

- Sérums

Les sérums employés sont adsorbés pendant une heure à +4° avec des hématies à 50%. On emploie 0,1 ml de globules rouges à 50% pour 1 ml de sérum.

3°) Préparation des hématies sensibilisées

a) antigènes

L'antigène employé dépend de l'immunisation préalable des lapins. L'antigène est, soit du complément frais et complet, soit des gamma-globulines de cobaye obtenues par précipitation avec le sulfate d'ammonium (65), soit des bêta₁C globulines de cobaye précipité par le Rivanol (103).

b) Préparation des globules rouges

A 3 ml d'AG (dilué au 1/10^e en eau physiologique tamponnée) on ajoute :

- 0,1 ml d'hématies à 50%
- 0,5 ml de B.D.B. dilué au 1/15^e (Dilué juste avant

l'emploi).

On agite pendant 15 mn à la température du laboratoire. Après cette agitation, on vérifie au microscope si les globules rouges ne sont pas agglutinés. On les centrifuge et les lave deux fois en eau physiologique

(1) - Solution d'Alsever : Dextrose anhydre : 20,05 g - ClNa: 8 g - citrate trisodique (5 H₂O): 4,2 g - Eau distillée : 1000 ml -. Le pH est ajusté à 6,1 avec une solution d'acide citrique à 5%. Stérilisation à la chaleur trois jours de suite à 100° pendant 30 mn.

lavage
tamponnée, puis un 3^e/se faisant en eau physiologique tamponnée additionnée d'albumine bovine. On remet en suspension le culot de globules rouges dans 2,5 ml d'eau physiologique tamponnée à pH 7,2.

4°) Réaction d'hémagglutination

a) Technique

Elle se fait sur des plaques ayant des chambres hémisphériques de 1. ml. A partir de 0,5 ml de sérum on fait les dilutions 1/10, 1/100, 1/1000, 1/2000.... en eau physiologique albumineuse. On met 0,5 ml de chaque dilution, puis on rajoute 0,05 ml de globules rouges sensibilisés.

<u>Dilution finale</u>	<u>1/10</u>	<u>1/100</u>	<u>1/200</u>	<u>1/400</u>
Sérum	0,1]	0,1]	0,5]	0,5]
H ₂ O phys. alb.	0,9]	0,9]	0,5]	0,5]
<u>Réaction</u>				
Sérum dilué	0,5	0,5	0,5	0,5
G.R. sensibilisés	0,05	0,05	0,05	0,05

b) Témoins

Pour chaque sérum on fait 2 témoins.

- Témoin globules rouges normaux: 0,5 ml de sérum additionné de 0,05 ml de globules rouges non sensibilisés. (Témoin T1)
- Témoins globules rouges sensibilisés: 0,5 ml d'eau physiologique albumineuse additionnée de 0,05 ml de globules rouges sensibilisés. (Témoin T2)

c) Lecture

Deux heures après la réaction est lue à la température du laboratoire. Le lendemain après une nuit à +4° on peut faire une nouvelle lecture.

5°) Interprétation des résultats

Pour pouvoir lire une réaction d'hémagglutination, il faut que les 2 témoins globules rouges (T₁ et T₂) soient négatifs. Alors la réaction est interprétable.

Dans le tableau VII nous voyons que les sérums anti-complément préparés par les différentes méthodes d'immunisation décrites précédemment, sont des immun-sérums spécifiques. Ils donnent une réaction d'hémagglutination négative avec le complément rendu inactif par chauffage à 56° pendant 30 mn.

Le sérum S_{100} (immunisation par la technique BEUTNER) et le sérum S_{105} (technique de BEUTNER modifiée) donnent une réaction d'hémagglutination avec le C' et les gamma-globulines de cobaye. Le titre en hémagglutination est supérieur pour le sérum S_{105} avec les deux antigènes (-C' -Gamma-globuline) par rapport à celui du sérum S_{100} . D'autre part, le sérum S_{105} donne une hémagglutination faible en utilisant la β_{1C} globuline comme antigène.

L'immunisation a été faite avec des complexes EAC'₁₄₂₃ ayant fixé la β_{1C} globuline. Cette hémagglutination est de 1/4000 pour le S_{105} , et de 1/1000 pour le S_{100} tandis que le S_{86} , immunisé par la fraction β_{1C} globuline possède un titre de 1/16000.

D - Fixation du complément (F.D.C')⁽¹⁾

C'est en fait une inhibition de la fixation du complément avec les sérums anti-complément à tester.

1°) Mise en oeuvre de la réaction

a) Technique

Les sérums sont toujours inactivés à $+56^{\circ}$ pendant 30mn. A la dilution de sérum (0,2 ml) on ajoute 0,2 ml de complément dilué, contenant 2 unités. Après une incubation d'une nuit à $+4^{\circ}$, 0,2 ml d'une suspension à 1% de globules rouges de mouton sensibilisés sont additionnés. Les tubes sont mis au bain-marie pendant 30 m, à 37°C . Le titre anti-complément des sérums est déterminé par la plus haute dilution de l'immun-sérum qui inhibe l'effet lytique du complément.

b) Témoins

La réaction de fixation du complément comporte des témoins généraux, qui sont destinés à contrôler le sérum hémolytique utilisé, à vérifier que le C' est bien présent à 2 unités à la fin de la réaction, enfin, que l'antigène n'a pas de pouvoir anti-complémentaire, ni de pouvoir hémolytique.

Méthode	Antigène	1/10	100	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000	Témoins
HUMMLER S 73	Ig. G cobaye	+4	+4	+4	+3	+3	+3	+3	+3	2+			0
HINUMA S 86	Ig. G B ₁ C	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+3	+3	2+			0
		+4	+4	+4	+3	+3	+3	2+					0
BEUTNER S 100	C' Ig. G B ₁ C	+4	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+3	+3	2+		0
		+4	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+3	2+			0
		+3	+3	2+									0
BEUTNER modifiée S 105	C' Ig. G B ₁ C C' inactif	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+3	+3	2+	0
		+4	+4	+4	+4	+4	+4	+3	+3	2+			0
		+4	+3	+3	+3	2+							0
		+											

TABLEAU VII - TITRAGE PAR LA TECHNIQUE D'HEMAGGLUTINATION CONDITIONNEE B D B

2°) Interprétation des résultats

a) Lecture

Elle s'exprime en croix (de 0 à +4) traduisant l'opacité due aux hématies intactes, après remise en suspension, c'est-à-dire correspondant à l'inverse de l'hémolyse. On fait la lecture lorsque l'hémolyse est totale dans les témoins généraux. Puis on lit les tubes réaction.

b) Résultats

Tableau VIII.

3°) Discussion

L'action inhibitrice des anticorps anti-C' sur la lyse des globules rouges sensibilisés ayant fixé le complément, prouvent leur fixation sur le complexe AG/AC/C'.

Un phénomène non spécifique de pouvoir anti-complémentaire a été exclu (67). La fixation du complément sur le complexe précédent a été confirmée par des dosages d'azote et l'emploi de carbone radioactif C_{14} marquant l'anticorps (67). L'analyse électrophorétique des sérums de lapin durant le processus d'immunisation montre une augmentation importante des gamma-globulines (48).

(1) - Lire désormais pour F.D.C' : Fixation du C'

	Dilutions :								
	1/20	1/30	1/40	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	T.G.
Méthode Hummeler S73	3+	2+	0	0	0	0	0	0	0
Méthode Hinuma S86	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0
Méthode Beutner S100	4+	3+	3+	3+	2+	0	0	0	0
Méthode Beutner modifié S105	4+	4+	3+	3+	3+	2+	2+	0	0

TABLEAU VIII - Titrage des immun-sérums anti C' par la méthode FDC' (méthode de KOLMER)

Les Sérums 73 et 86 ont un titre en inhibition de la FDC' très faible.

Pour le Sérum S100, nous avons un titre du 1/100, tandis que pour le Sérum S105 nous obtenons un titre du 1/140.

Nous avons par la suite titré l'activité anti-C' des gamma-globulines précipitées par le $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et du conjugué préparé avec celles-ci. Les globulines du sérum S105 et le conjugué C105 en dérivant donnent un titre du 1/100, plus faible que le sérum brut. Mais la conjugaison ne détériore pas l'activité anticorps des immun-sérums car nous retrouvons le même titre du 1/100.

III - VALEURS DES IMMUNS SÉRUMS CONJUGUES

=====

Méthode Mutsaars	Conjugué	C64	Conjugué nul	0
Hummeler		C73	mauvais	+
Hinuma		C86	faible	+ ⁺
Beutner		C100	faible	+ ⁺
Beutner modifiée		C105	satisfaisant	+++
Conjugués commercialisés				
NBC		CNBC	insuffisant	++
DIFCO		CDIFCO	mauvais	+

TABLEAU IX - Valeur des conjugués obtenus à partir des immun-sérums préparés selon les différentes méthodes d'immunisation.

Les immun-sérums conjugués au FITC ont été testés avec la recherche des auto-anticorps antinucléaires. La valeur des conjugués est chiffrée en croix, admettant ++++ pour une image très fluorescente, et + lorsque le noyau des leucocytes est peu fluorescent (Tableau IX).

A - Discussion :

Dans le Tableau X nous reprenons pour chaque méthode d'immunisation les résultats des titrages obtenus par les différentes techniques exposées précédemment.

- 1°/ La méthode du test de l'anneau à AC constant ne renseigne pas suffisamment sur la qualité des AC produits au cours de l'immunisation. Il nous permet seulement de voir si l'immunisation est suffisante ou si l'on doit la prolonger. On tient compte seulement d'un titre de $5 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-5} avec un précipité à +++ . Alors nous pouvons envisager les deux autres méthodes de dosages des AC.

Immunisation	MUTSAARS	HUMMLER	HINUMA	BEUTNER	BEUTNER modifié	N B C	DIFCO
Fractions A G	C' complet	gamma- globuline	Ig G+B ₁ C globuline	E A C'	E A C'		
Test de l'anneau	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴		
Immuno-diffu sion	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴		
Hémaggl. BDB Ig G B ₁ C C'		64 000	64 000 16 000	128 000	256 000	128 000	64 000
F D C'		1/30	1/40	1/100	1/140	1/160	1/60
Conjugué	C 64	C 73	C 86	C 100	C 105	C NBC	C DIFCO
I.F. anti-noyaux	-	+	+ ±	+ ±	+++	++	+

TABLEAU X

COMPARAISON DU TITRAGE DES SERUMS ANTI-C' OBTENUS
PAR LES DIFFERENTES METHODES D'IMMUNISATION DECRITES.

- 2°/ l'hémagglutination passive permet de donner le titre des immun-sérums contre les différents antigènes, gamma, β_1 C globulines et complément total, utilisés.

- vis-à-vis du C' total le meilleur titre est donné par la méthode de BEUTNER modifiée

- vis-à-vis du β_1 C nous avons le titre le plus élevé avec la méthode d'HINUMA.

- 3°/ la FDC' est sûrement la meilleure méthode pour apprécier la valeur antigénique d'un immun-sérum préparé par injections de complexes ayant fixé le C'.

Le meilleur titre fut donné par des globulines anti C' commercialisées par NBC qui est de 160. Avec les antisérums que nous avons préparés, la méthode de BEUTNER modifiée donne un titre de 140. Avec la F.D.C' nous avons pu titrer le conjugué préparé après précipitation des anti gamma-globulines à partir du sérum brut. Nous avons un titre de 100 seulement. HINUMA (43), après immunisation des lapins obtient un sérum brut titrant 320 contre le C'. Une fois conjugué les anti gamma-globulines anti C' n'ont plus qu'un titre de moitié.

B - Conclusion

En comparaison de ces différentes techniques de titrage des immun-sérums en vue de préparation de conjugué anti C' utilisé dans la recherche des auto-anticorps antinucléaires, nous gardons deux techniques pour avoir une juste valeur antigénique des sérums et obtenir après précipitation et conjugaison des sérums, des conjugués satisfaisants. D'après nos expériences, nous exigeons pour les immun-sérums les titres suivants :

- Hémagglutination conditionnée contre C' : ≥ 256000
- Fixation du Complément..... : ≥ 140

Ainsi, avec les valeurs retenues d'après ces expériences, le conjugué le plus satisfaisant est donné par la méthode de BEUTNER modifiée.

Le conjugué C86 préparé avec la méthode d'HINUMA possède un

titre élevé en hémagglutination conditionnée contre le β_{1C} mais donne une image fluorescente faible pour son utilisation en I.F. Le sérum commercial NDC, bien qu'ayant un titre élevé de 160 en FDC' ne nous a pas donné un conjugué valable en IF. Nous voyons que son titre en hémagglutination conditionnée est trop faible.

=====

CHAPITRE IV

--

MARQUAGE DES IMMUNS SERUMS

I - PRINCIPE

L'Immuno-fluorescence est une technique "immuno-histo-chimique" de détection de la réaction AG/AC. L'antigène ou l'anticorps étant conjugué à un fluorochrome, l'examen sous un rayonnement "excitateur" d'une préparation les mettant en présence permet de visualiser et de localiser cette réaction.

II - REALISATION

Nous allons rappeler le procédé de la conjugaison qui doit être simple et aussi rapide que possible.

Après la conjugaison, le mélange renferme de nombreuses substances responsables de la non-spécificité, d'où la purification du conjugué que nous traiterons dans un chapitre particulier.

A - Technique de conjugaison

Le marquage nécessite des points techniques importants :

- La concentration des anticorps par précipitation de la fraction globulinique brute.
- La dialyse de la solution globulinique reconstituée et la détermination de son taux d'azote.
- La conjugaison avec le colorant pour obtenir l'anticorps fluorescent.

1° - Concentration des anticorps par précipitation de la fraction gamma-globulinique (65).

Cette concentration est indispensable pour éliminer le plus possible des protéines immunologiquement indifférentes dont la présence, au sein du conjugué, diminuerait considérablement la spécificité de la réaction.

Pour obtenir la fraction gamma-globulinique on effectue un fractionnement de l'antisérum au sulfate d'ammonium comme l'indique COONS et DEACON. Toutes les opérations de ce fractionnement s'effectuent à +4°.

Le mode opératoire est le suivant :

- A un volume de sérum on ajoute un volume d'eau physiologique tamponnée à pH 7,2 (1).

- Progressivement on additionne deux volumes de sulfate d'ammonium à saturation, soit 62%.

- Durant l'addition du sulfate d'ammonium, on agite continuellement. Cette agitation se fait sur un agitateur magnétique pendant 15 minutes à faible vitesse, puis on laisse reposer une à deux heures à 4° la solution protéinique.

- On centrifuge pendant 10 minutes à 6000 tours.

- Le précipité recueilli est lavé avec la solution de sulfate d'ammonium à 1/2 saturation, de manière à se débarrasser complètement de l'hémoglobine. Le culot de centrifugation représente la fraction gamma-globulinique.

2° - Dialyse de la solution globulinique et détermination de son taux d'azote.

(1) - Eau physiologique tamponnée - pH 7,2

PO ₄ HNa ₂	12 M 20.....	21,4 g
PO ₄ H ₂ K		5,4 g
NaCl	 q.s.p. 10 l..	87 g

a) Dialyse

Le culot de globuline est remis en suspension dans une solution saline tamponnée dont on utilise un volume égal au 1/3 du volume initial de sérum.

La solution globulinique ainsi obtenue est placée dans un sac à dialyse. La dialyse en eau saline tamponnée s'effectue à +4° sur un agitateur magnétique.

Le bain de dialyse doit être changé 3 à 4 fois par jour. L'opération doit être poursuivie jusqu'à complète disparition de l'ion ammoniacal ce que l'on vérifié avec le réactif de NESSLER ⁽¹⁾:

eau de dialyse	10 ml
acide sulfurique.....	0,3 ml
réactif de Nessler.....	5 ml

En présence de l'ion ammoniacal, il se produit un précipité orange. La réaction est négative lorsqu'elle présente une teinte identique à celle du tube témoin où l'eau de dialyse est remplacée par 10 ml d'eau saline tamponnée.

b) Détermination du taux d'azote

Le taux des protéines dans la solution des gamma-globulines est effectué par le réactif du Biuret (34), selon la technique de GORNALL.

En milieu alcalin les ions Cu^{++} donnent avec les protéines une coloration bleue violacée se prêtant à un dosage colorimétrique.

- Réactif cuprotartrique de GORNALL :

Sulfate de cuivre (SO_4Cu , 5 H_2O).....	1,5 g
Tartrate double de sodium et de potassium	6 g
Soude décarbonatée	30 g
Iodure de potassium	1 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Ce réactif se conserve bien à l'obscurité, en flacon paraffiné.

(1) - Rf. NESSLER.

Biodure de Hg	45,5 g
Iodure de K	34,9 g
Eau distillée.....	500 ml

Faire dissoudre. Ajouter 200 ml d'une solution de potasse (KOH, 10M). Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée. Laisser le précipité se sédimenter.

- Gamme étalon.

Elle est préparée en diluant une solution protidique de référence (Mono-Trol. MERIEUX à 70 p.1000 de protéines) au 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80 en eau saline tamponnée.

- La réaction.

Dans un tube à essai on met :

- . Solution protidique à titrer (diluée au 1/10) 1 ml
- . Réactif cuprotartrique 4 ml

On laisse développer la réaction 30 mn à l'obscurité, à une température de 20 à 25°. La lecture se fait au photomètre à une longueur d'onde de 550 milli-microns (Ecran vert), par rapport à un témoin où la solution protidique est remplacée par 1 ml de solution saline tamponnée.

- Résultats -

En se référant à la courbe étalon, on détermine le taux de protéines contenu dans le sérum. La concentration protidique généralement trouvée varie entre 20 et 35 mg par ml.

3° - Conjugaison des anticorps avec un composé fluorescent.

On emploie la méthode de MARSHALL (70) pour réaliser la conjugaison du FITC avec les immuno-globulines. Cette conjugaison conduit à la fixation du fluorochrome sur la globuline anticorps.

L'isothiocyanate de fluorescéine (F.I.T.C.) est le composé le plus largement utilisé ; il se présente sous forme d'une poudre jaune-orangé ou de paillettes brun foncé. Le marquage se fait à +4°C en mélangeant dans l'ordre indiqué plus loin, les globulines et solutions tampons, de façon à obtenir un volume final ayant une concentration de 1% en protéines.

Le FITC est pesé à raison de 0,04 mg par milligramme de protéines, contenues dans la solution de globuline titrée (91).

Le FITC est dissous dans un volume égal au 1/10 du volume final, de solution saline tamponnée carbonate-bicarbonate de Na (pH 9,0 - 0,5 M)⁽¹⁾.

On additionne lentement à la solution globulinique, la solution de FITC. Le volume final désiré est obtenu en complétant par la solution tampon pH 7,2. L'union globuline-fluorochrome se fait dans un bécher pendant 18 heures à +4°C par agitation magnétique.

Remarque: Le pH final doit être situé entre pH 8,6 et pH 8,8 (25)(26) mais comme l'a fait remarquer GOLDMAN, l'absorption du conjugué sur poudre d'organes fait passer le pH nettement alcalin à un pH de l'ordre de 5,5. Il faut donc un pouvoir tampon élevé pour que l'intensité de la fluorescence du FITC soit maximum avec un pH 8,0.

Le conjugué obtenu doit être dialysé contre une solution saline tamponnée pH 7,2 (PO_4HNa_2 12 M 20 - 2,14 g ; PO_4KH_2 - 0,54 g ; NaCl - 8,7 g) à +4°C en changeant souvent la bain de dialyse. On élimine ainsi une partie du FITC non conjugué et les sels tampons (13).

Le conjugué ainsi obtenu doit être stable. Il est conservé à -20°C, réparti en tubes maigres.

La préparation d'un conjugué est facilement réalisable, mais avant tout il ne faut pas dénaturer les globulines. Aussi faut-il travailler constamment à +4°C. Enfin, la spécificité du conjugué obtenu dépend du titre plus ou moins élevé de l'immun sérum utilisé pour sa préparation.

(1) Tampon carbonate/bicarbonate de Na pH 9,0.

Carbonate de Na : 26,5 g dans 500 ml d'eau distillée
Bicarbonate de Na : 21 g " " " "

Prendre 4 parties de la solution de bicarbonate de Na et une partie de la solution de carbonate de Na. Ajuster à pH 9,0.

CHAPITRE V

PURIFICATION DES CONJUGUES

La méthode des anticorps fluorescents est l'une des techniques qui permet de déceler et de localiser les antigènes dans les tissus, les liquides de l'organisme et d'autres milieux. Elle convient donc pour l'étude de la pathogenèse des maladies infectieuses et des troubles immunologiques. Elle permet également de différencier des souches étroitement apparentées, et d'approfondir les recherches sur le lieu et le mode de formation des anticorps.

Mais cependant cette méthode a ses limites ; la présence dans le conjugué de colorant fluorescent non conjugué, ou bien la faible spécificité de certains sérums, sources de réactions croisées, peuvent conduire à des fluorescences non spécifiques.

Nous avons essayé de résoudre ces problèmes en abordant les trois paramètres entrant dans la préparation d'un conjugué.

- 1° - Le fluorochrome : qui, plus ou moins pur, devra être purifié par chromatographie-par électrophorèse.
- 2° - Les globulines : qui, plus ou moins spécifiques, devront être fractionnées en employant diverses techniques de séparation - physicochimique - immunologique.

3° - La conjugaison : qui peut laisser du colorant libre, sera éliminé sur Sephadex G 25 - poudre d'organes.

Enfin, l'emploi de la technique d'immunofluorescence est limitée pour la recherche en virologie, par l'autofluorescence jaune verte de certains tissus ou cellules employés pour la culture des virus.

4° - L'autofluorescence : atténuation par des colorants contrastants : Lissamine - Rhodamine - Bleu Evans.

I - LE FLUOROCHROME

=====

GOLDMAN et CARVER (28) montrèrent par absorption sur papier l'instabilité de l'isocyanate de fluorescéine. L'introduction par MARSHALL et ses collaborateurs (70) de l'isothiocyanate a grandement simplifié la préparation des conjugués. Il est préparé en traitant une amino-fluorescéine par la thiophosgène.

L'inconvénient de cette synthèse est que nous obtenons deux isomères. D'autre part, en solution le F.I.T.C. se dégrade et donne des produits qui ont les mêmes propriétés fluorescentes et la même capacité de fixation sur les groupements amines des protéines.

Nous avons testé 9 lots de F.I.T.C. et les 9 conjugués que nous avons faits avec des anti-gamma-globulines humaines obtenues en immunisant des lapins (85). Ces lots de F.I.T.C. ont été testés par 3 méthodes:

- Electrophorèse
- Spectrophotométrie
- Immuno-fluorescence.

1° - L' Electrophorèse

Le F.I.T.C. dont la synthèse a été réalisée par RIGGS (96) se présente sous forme de poudre ou de paillettes stables quand il est sec. Par chromatographie sur papier FELTON et Mac MILLON ont séparé des produits de dégradation du F.I.T.C. CURTAIN (19) fractionne les anti-sérums marqués par

électrophorèse. Puis HALIKIS et ARQUILUA séparèrent trois isomères du F.I.T.C. dans les fluorochromes commercialisés. Deux de ces isomères sont des produits de dégradation (39).

Nous avons testé 9 lots de conjugués après dialyse et filtration sur milipores par électrophorèse sur papier. La bande de papier est imbibée de solution tampon (Véronal, Véronal sodique pH 8,6). On dépose en ligne 10 mm³ de conjugué et l'on applique aux bornes de l'appareil à électrophorèse une tension de 300 v. Dans le champ électrique la globuline se comporte comme un anion et se dirige vers le pôle positif. Après 12 heures de migration les bandes électrophorétiques sont passées sous une lampe à ultraviolet pour révéler les spots de fluorescéine et aux vapeurs de Brome pour donner un composé stable, rose, le tétra-bromo-fluorescéine ou éosine.

- Résultats -

Nous avons révélé, après migration électrophorétique pour deux lots de F.I.T.C. conjugués à des anti-gamma-globulines, un seul composé (composé I) fluorescent. Les autres bandes développées aux U.V. et aux vapeurs de Brome ont montré des lots de F.I.T.C. dégradés en 2 ou 3 composés plus rapides (Tableau XI) dans le champ électrique (composés I, II et III).

Nous avons fait un témoin avec les anti-gamma-globulines utilisés dans la conjugaison des lots de FITC. Après coloration avec le Vert-Lumière, nous obtenons une seule bande correspondant à la fraction gamma-globuline - ceci a été confirmé par l'immuno-électrophorèse qui nous a donné un seul arc de précipitation (gamma / anti-gamma-globuline).

- Discussion -

L'électrophorèse sur papier a montré que les lots de conjugué conservés à -20° se dégradaient. Les produits dégradés II et III se trouvant dans les conjugués confèrent aux préparations en immuno-fluorescence, une fluorescence non spécifique.

Nous avons révélé les globulines liées au F.I.T.C. par le Vert-Lumière. Le composé I est lié aux gamma-globulines.

Le composé II est couplé à des gamma -globulines non anticorps (Immuno-électrophorèse) ou correspond à du F.I.T.C. libre. Le composé III est toujours du F.I.T.C. libre qui peut être un isomère ou un composé dégradé du F.I.T.C. .

Nous avons fait une électrophorèse, après gel-filtration sur Séphadex G 25 et absorption sur poudres d'organes, des lots de conjugués anti-gamma-globuline. Dans chaque lot nous retrouvons le plus souvent que le composé I. Les composés II et III responsables de la fluorescence parasite sont éliminés par cette double filtration-absorption.

2° - Spectrophotométrie

Le spectre d'absorption se situe pour les 9 lots de conjugués que nous avons utilisés entre 4400 Å° et 5900 Å°. Ceci correspond à la lumière qu'émettent les fluorochromes quand ils sont excités par les longueurs d'onde précédentes.

D'après les courbes faites au spectrophotomètre en ultra-violet (JOBIN-YVON) le maximum d'absorption de la fluorescéine et du conjugué sont à 480 millimicrons.

Les courbes d'absorption ont été également faites avec le réactif du Biuret plus la protéine, le réactif du Biuret seul puis les deux en présence de fluorescéine (Courbes I et II).

D'après ces courbes on peut déterminer directement la concentration de la fluorescéine à 480 millimicrons, et celle de la protéine à 560 millimicrons après addition du réactif du Biuret.

Ces deux maxima d'absorption permettent de déterminer le rapport fluorescéine/protéine (F/P).

- Résultats -

Nous avons vérifié , pour les 9 lots de F.I.T.C. le rapport F/P avant et après dialyse, et nous rapportons les résultats dans le tableau suivant (Tableau XII).

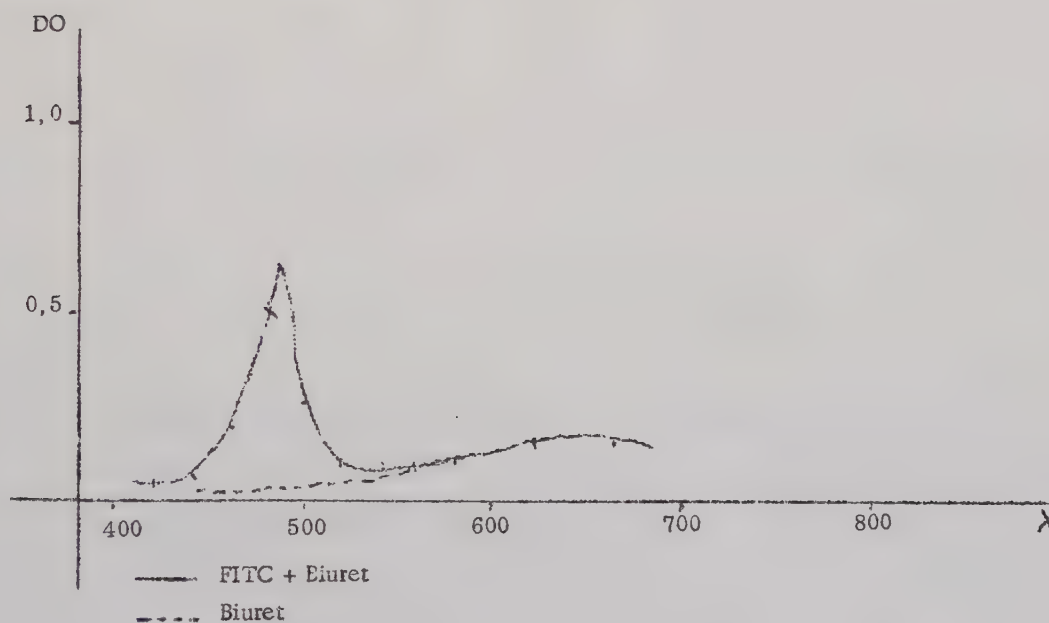
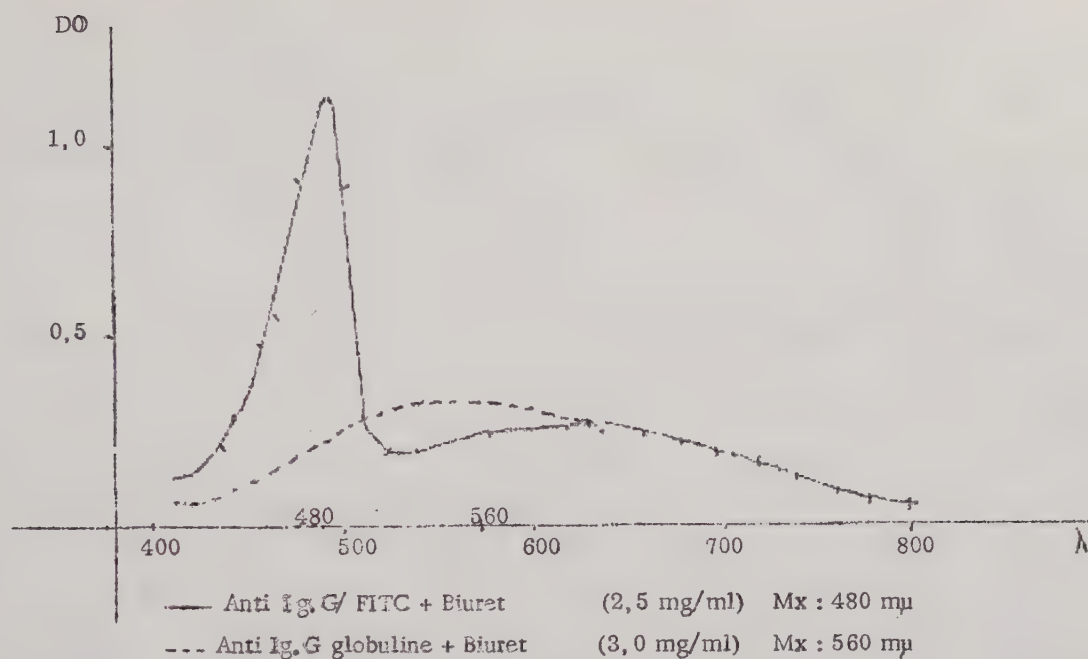
F.I.T.C.	Electrophorèse						
	Ig G / FITC	Dialyse filtration sur millipores			Gel Filtration Séphadex G25 Poudre d'organes		
	Composés	I	II	III	I	II	III
JJL 226	C 51	+°	+ ^{ooo}		+°		
JJL 228	C 52	+°			+°		
JJL 187	C 50	+°	+ ^{oo}	+ ^{ooo}	+°	+ ^{oo}	
RG 287	C 49	+°	+ ^{ooo}		+°		
JJL 240	C 54	+°	+ ^{oo}		+°		
CS 1722	C 48	+°			+°		
OSB 1566	C 55	+°	+ ^{oo}	+ ^{ooo}	+°	+ ^{oo}	
JJL 229	C 53	+°	+ ^{ooo}		+°		
OSB 1567	C 56	+°	+ ^{oo}	+ ^{ooo}	+°		

Protéines liées

Ig G	AC	°
Ig G	non AC	^{oo}
FITC	libre	^{ooo}

TABLEAU XI

DEGRADATION DES GAMMA-GLOBULINES CONJUGUEES AU FITC,
MISE EN EVIDENCE PAR ELECTROPHORESE.



COURBES I et II - Courbes d'absorption en spectrophotométrie des Anti-Ig.G
et Anti-Ig.G conjugué en présence de RF du Biuret.

Lot FITC	Conjugué	Conjugaison FITC / Ig G	Dialyse FITC / Ig G	Extinction
JJL 226	C 51	1/200	$5,0 \times 10^{-3}$	1600
JJL 228	C 52	1/200	$4,7 \times 10^{-3}$	1000
JJL 187	C 50	1/200	$4,5 \times 10^{-3}$	1200
RG 287	C 49	1/200	$4,8 \times 10^{-3}$	1200
JJL 240	C 54	1/200	$3,8 \times 10^{-3}$	1000
CS 1722	C 48	1/200	$3,5 \times 10^{-3}$	1200
OSB 1566	C 55	1/200	$3,0 \times 10^{-3}$	800
JJL 229	C 53	1/200	$2,9 \times 10^{-3}$	400
OSB 1567	C 56	1/200	$2,1 \times 10^{-3}$	1000
JJL 226	C 63	1/200	$5,2 \times 10^{-3}$	1600

TABLEAU XII

COMPARAISON DU RAPPORT F / P AVANT ET APRES DIALYSE
POUR 9 LOTS DE FITC CONJUGUES AVEC LES MEMES ANTI-
GAMMA GLOBULINES HUMAINES.

- Discussion -

Le rapport F/P des 9 lots s'étage de 2,1 à $5,2 \times 10^{-3}$. Les rapports les plus élevés donnent la meilleure image en I.F.

Pour GOLDWASSER et SHEPARD (31) le rapport F/P doit être compris entre 3,8 et $5,5 \times 10^{-3}$ pour avoir une bonne fluorescence.

GOLDSTEIN et ses collaborateurs (29) rapportent que le fractionnement sur D.E.A.E. cellulose de conjugué anti-gamma-globuline, donne des fractions ne présentant peu ou pas de non-spécificité. Ces fractions possèdent un rapport F/P situé entre 2,0 à $3,5 \times 10^{-3}$ et que la non-spécificité était en rapport avec F/P élevé.

Nous avons obtenu des résultats semblables en fractionnant les conjugués sur Sephadex G 200. Les fractions correspondant aux 7S globulines donnent un rapport F/P bas, tandis que les 19 S globulines donnent des rapports plus élevés. Les résultats sont donnés dans le Tableau XV.

3° - L'Immuno-fluorescence

Les conjugués ont été employés dans la recherche des anticorps antinucléaires (59) par la méthode indirecte. Nous avons étudié les conjugués selon deux méthodes :

- Dilution du conjugué jusqu'à son extinction.
- Dilution du sérum positif donnant encore une fluorescence à deux croix.

La fluorescence nucléaire est chiffrée par une notation en croix admettant ++++ pour la fluorescence nucléaire maximum et d'une croix pour la fluorescence la moins importante mais encore homogène et non tachetée.

Pour chaque conjugué nous obtenons une extinction de la fluorescence nucléaire, ceci pour une dilution fixe du sérum positif au 1/64 (pour éliminer les phénomènes de zones que l'on retrouve avec le sérum utilisé pur ou au 1/8). Nous avons les résultats dans le tableau XII.

Avec les dilutions successives du sérum positif nous obtenons une seconde classification des conjugués. Nous prenons la dilution du sérum qui donne encore deux croix avec la dilution du conjugué la plus élevée.

Tableau XIII.

Résultats

En fonction de l'extinction nucléaire et du rapport de dilution du sérum et du conjugué nous pouvons apprécier la valeur des différents conjugués entre eux comme suit en valeur décroissante :

Conjugué C 51 correspondant au lot	JJL 226
C 50	JJL 187
C 49	RG 287
C 52	JJL 228

puis nous trouvons les conjugués de titre plus faible

C 54	JJL 240
C 48	CS 1722
C 56	OBS 1567
C 55	OBS 1566
C 53	JJL 269

D'autre part, tous ces résultats peuvent être groupés en faisant un tableau à double entrée avec les dilutions du sérum ^{en}abcisse et les dilutions du conjugué en ordonnée. Nous retrouvons la classification ci-dessus. Si pour chaque conjugué nous indiquons également le rapport F/P nous voyons qu'il est croissant du conjugué C 53 au C 51, et que la meilleure fluorescence est obtenue lorsque F/P est compris entre $3,8$ et $5,5 \times 10^{-3}$, ce qui confirme le travail de GOLDWASSER et ses collaborateurs (31). Tableau XIV.

TABLEAU XIII - EXTINCTION DE LA FLUORESCENCE NOTEE EN CROIX PAR DILUTION DU CONJUGUE
ET DU SERUM TEMOIN POSITIF.

[illegible][illegible][illegible]

C \ S	1/8	1/64	1/512	1/1024	1/2048	
C.1/10			C.53			$2,9 \times 10^{-3}$
C.1/20			C.55			$3,0 \times 10^{-3}$
C.1/40			C.48			$3,5 \times 10^{-3}$
		C.56				$2,1 \times 10^{-3}$
		C.54				$3,8 \times 10^{-3}$
			C.49			$4,8 \times 10^{-3}$
			C.50			$4,8 \times 10^{-3}$
			C.52			$4,8 \times 10^{-3}$
				C.63		$4,8 \times 10^{-3}$
				C.51		$5,0 \times 10^{-3}$
						F/P

TABLEAU XIV

CLASSIFICATION DES CONJUGUES ANTI-GAMMA HUMAINES EN FONCTION DE LA DILUTION MAXIMALE DU CONJUGUE, DE L'EXTINCTION NUCLEAIRE ET DU RAPPORT F / P.

II - LES IMMUNO-GLOBULINES

=====

Nous avons à notre disposition diverses techniques de séparation qui diffèrent essentiellement suivant que nous voulons obtenir des immuno-globulines pures ou simplement des solutions enrichies en immuno-globulines.

1° - Enrichissement des immuno-globulines par relargage.

Comme nous l'avons vu précédemment la fraction gamma-globuline active est séparée de l'anti-sérum par une double précipitation à +4° avec une solution de sulfate d'ammonium 2,1 M. La fraction globulinique est dissoute dans de l'eau saline tamponnée. La phase suivante est la dialyse qui se fait contre une solution NaCl à 0,85% ou une solution tamponnée saline à pH 7,2. Cette dialyse qui se fait à +4° permet d'éliminer le sulfate d'ammonium en excès. L'ion ammonium NH_4 peut fausser la réaction du biuret, ce qui entraîne un excès de F.I.T.C. par rapport à la véritable quantité de protéine (51).

2° - Globulines immunes purifiées

Nous avons au départ soit l'anti-sérum brut, soit des immuno-globulines enrichies mais ayant des impuretés.

La chromatographie sur résine échangeuse d'ions telle que la DEAE-Cellulose, ou par "gel-filtration" sur Séphadex donne une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire (89).

Une autre méthode très particulière consiste à utiliser la propriété anticorps des immuno-globulines. L'anticorps précipite avec l'antigène connu ; le précipité est redissous en fonction de ses propriétés physico-chimiques. On sépare les deux éléments du complexe AG/AC et l'on obtient une immuno-globuline pure.

BURSTEIN et ses collaborateurs (12) ont montré que les antigènes adsorbés à la surface de particules inertes telles que le sulfate de baryum, le kaolin, le collodion, réagissaient spécifiquement avec l'anticorps correspondant.

L'immun-sérum de lapin préparé contre des gamma-globulines humaines est épuisé avec des gamma-globulines humaines diluées au 1/10 contenant 7 mg/ml. Le précipité^{est} recueilli par centrifugation à +4°. On lave plusieurs fois le précipité avec NaCl à 9 pour mille .

- Isolement des anticorps spécifiques.

Le précipité spécifique AG/AC est dissous dans une solution tamponnée acide préparée de la façon suivante :

Tampon Michaelis..... 10 vol.
NaCl 9% 1 vol.
HCl N...q.s.p. obtenir pH 1,8 à 2,0

Le précipité est dissous dans une quantité de solution acide telle que ce volume représente le volume initial de l'anti-sérum. Sa dissolution s'effectue en quelques minutes. Au liquide opalescent on ajoute du sulfate de baryum en poudre à raison de 6 g pour 10 ml. La suspension est agitée quelques minutes puis elle est centrifugée 5 mn à 3000 t/mn pour éliminer le sulfate de baryum. On décante le surnageant qui est neutralisé par la NaOH N jusqu'à pH 7,0.

Si l'absorption de l'antigène sur le sulfate de baryum est insuffisante, ce qui est généralement le cas, celui-ci précipite spontanément après neutralisation. On refait les mêmes opérations avec ce nouveau précipité. Puis les anticorps sont relargués par le sulfate d'ammonium à 40% à +4°. Le précipité obtenu est dissous puis dialysé.

Cette méthode est assez rapide, mais elle possède deux inconvénients majeurs : la quantité d'anticorps récupérée est faible et l'antigène utilisé est perdu.

GYENES et SEHON (37) ont publié une méthode d'obtention d'un complexe polystyrène-protéine pour l'isolement des anticorps. L'antigène est conjugué avec une cellulose-polystyrène qui sert de support insoluble. L'anticorps réagira avec l'antigène fixé sur le support. Les protéines non spécifiques du sérum peuvent être aisément enlevées par lavage de l'immun-absorbant avec une solution de chlorure de sodium 0,85% à pH 7,0. Après ce lavage il ne reste que le complexe AG/AC qui sera décroché par lavage avec une solution tampon boratée. Ensuite il n'y a qu'à concentrer l'anticorps recueilli au bas de la colonne, contre du carbowax.

- Isolement par chromatographie.

a) DEAE-Cellulose.

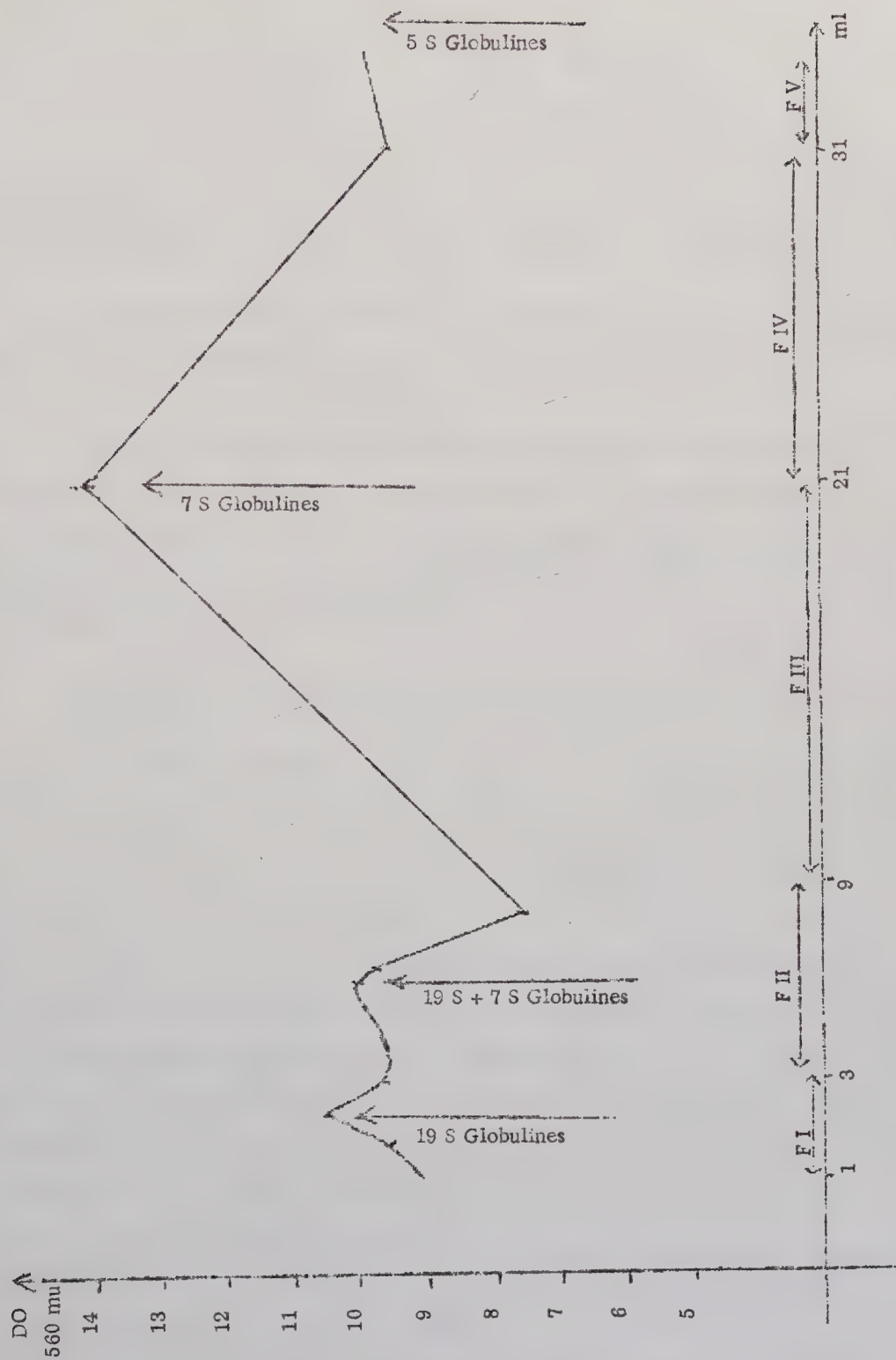
Nous avons employé la technique de STANWORTH vu précédemment pour préparer des anti-gamma-globulines. La préparation de la DEAE-cellulose pour faire cette préparation est longue. D'autre part, en fin de fractionnement il faut rééquilibrer la colonne. Le seul avantage obtenu avec la DEAE-cellulose serait la séparation des molécules hautement marquées, responsables de la fluorescence non spécifique (90).

b) Séphadex G 200.

Les travaux de MAYERSBACH et SHUBERT (73) montrent que la fluorescence non spécifique était due à l'affinité des charges positives des protéines du substrat pour l'électronégativité des molécules du fluorochrome. Puis ceux de Mac KINNLEY et SPILLANE (69) montrèrent que le couplage de la fluorescéine avec les différents types de sérums se faisait dans des proportions très différentes. Ils observèrent également que les grosses molécules produisaient le plus de fluorescence non spécifique. A la suite de ces travaux, BROOKS et ses collaborateurs (9) séparèrent les sérums en fractions globuliniques 19S et 7S en employant la gel-filtration sur Séphadex G 200. Cette séparation est faite sur une colonne de 27 cm de haut et de 2 cm de diamètre. Le Séphadex est mis à gonfler une nuit dans un tampon salin phosphaté à 7,2 dans la proportion de 1/10. Le Séphadex est mis dans la colonne d'une façon homogène puis on ajoute du tampon pour l'équilibrer.

On applique 2 ml de conjugué en haut de la colonne lorsque celle-ci n'est plus recouverte par le tampon qui s'écoule. Le conjugué pénètre dans Séphadex. On commence l'élution en appliquant le tampon (NaCl 0,15 M - $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,01 M - KH_2PO_4 0,01 M - pH 7,2). Le gradient de poids moléculaire des protéines permet de récupérer différentes fractions du conjugué.

Ce fractionnement peut se faire également en utilisant un éluant 0,1 M (23) préparé avec :



COURBE III - Séparation par Gel-Filtration sur Séphadex G 200 des 19 S et 7 S globulines.

Tampon Tris (1)	}	pH : 8,0
HCl		
NaCl		

Les fractions de 1 ml recueillies avec le collecteur de fractions, sont photométrées après avoir réalisé la réaction du biuret. Nous traçons la courbe en fonction de la densité optique obtenue à 560 millimicrons.

Nous obtenons un pic pour les globulines 19 S et 7 S. Nous recueillons les trois premiers ml, puis les 6 suivants, ensuite les 12, 10 et 60 ml qui forment les fractions I, II, III, IV et V. (Courbe III).

Après ce fractionnement, nous retrouvons en pratique 90% des fractions protéines initiales. Nous avons fait les associations des fractions I et II (19S), puis III et IV (7S) que nous avons testées avec la recherche des anticorps antinucléaires. Le meilleur Pool est donné par les fractions III et IV correspondant aux 7 S globulines.

- Application au conjugué anti-complément.

Les deux conjugués C_{100} et C_{105} nous ont donné en I.F. avec tous les systèmes dans lesquels ils furent testés, des réactions faussement positives. Le rapport F/P de chacun des conjugués fut estimé à $7,1 \times 10^{-3}$ pour le C_{100} et $7,5 \times 10^{-3}$ pour le C_{105} . Après passage sur Séphadex G 200, le rapport F/P de chaque fraction se situe entre $2,1$ et $3,9 \times 10^{-3}$ pour le C_{105} et de $2,1$ à $5,2 \times 10^{-3}$ pour le C_{100} . Les immuno-globulines 19 S (F.I et F.II) donnent le rapport le plus élevé. L'emploi de ces deux fractions en I.F. donne une forte fluorescence parasite. Les immuno-globulines 7 S correspondant (F.III et F.IV) possèdent un rapport $\frac{F}{P}$ entre $2,2$ et $2,5 \times 10^{-3}$. Les deux fractions F.III et F.IV utilisées en I.F. donnent un fond net avec des images très brillantes et n'amènent pas de fausses réactions (Tableaux XV et XVI).

(1) Tampon Tris -	Sol. A : 2 amino-2 hydroxyméthyl 1-3 propanediol 0,1 M (12,1 g/l)
	Sol. B : HCl 0,1 M
	Sol. A (25 ml) + Sol. B (13,4 ml) complété à 100 ml.

Conjugué Anti - C'	Fractions	I. F. ANTI - C'			
		AC. antinucléaires		AC. antitréponémiques	
		sérum + 1/64	sérum -	sérum + 1/200	sérum -
C 105	Total	3+	1+	2+	2+
F I	19 S	3	2	3	2
F II	19 S	3	2	3	3
F III	7 S	4	0	2	0
F IV	7 S	4	±	2	0
F V	5 S	2	1	1	±
POOL III+ IV	7 S	4	0	2	0

TABLEAU XV

Comparaison des fractions obtenues sur Séphadex G 200 et du conjugué total anti-C' dans la recherche des auto-anticorps antinucléaires et des anticorps antitréponémiques.

POOLS	VOL. élué ml	PROTEINES mg	VOL. concentré	UNITES SVEDBERG	F/P avant dialyse	F/P Séphadex G 200
C 105	2,0	18		19 S + 7 S	$7,5 \times 10^{-3}$	$x 10^{-3}$
F I	3,0	2,1	2,0	19 S		3,9
F II	6,0	1,2	1,0	19 S + 7 S		3,5
F III	12,0	7	2,0	7 S		2,5,0
F IV	10,0	4,5	2,0	7 S		2,2
F V	60,0	2,0	2,0	7 S		2,1
F III+IV	22,0		4,0	7 S		

TABLEAU XVI

Fractionnement des gamma-globulines anti-complément conjugués, sur Séphadex G200.

- Discussion -

Comme l'ont montré GOLDSTEIN et ses collaborateurs (29) en fractionnant sur D.E.A.E.-cellulose, nous sur Séphadex G 200, nous obtenons un rapport F/P de 2,2 et $2,5 \times 10^{-3}$ pour le pool III et IV représentant les gamma - globulines 7 S.

Les immuno-globulines 19 S ont un rapport F/P plus élevé et amènent une fluorescence parasite plus intense ce qui confirme les travaux de Mac KINNEY et SPILLANE (69).

Les globulines 19 S sont responsables de la plus grande partie de la fluorescence non spécifique. Les globulines 7 S contiennent la presque totalité de la fluorescence spécifique. L'élimination des 19 S des conjugués est avantageuse mais dépend de la fraction antigénique contenant la spécificité - ceci dépend de l'antigène employé, de l'animal immunisé, de l'intensité et du temps d'immunisation, qui donne des anticorps spécifiques soit dans les fractions globuliniques 19 S soit 7 S.

Ainsi, cette séparation des fractions 19 S et 7 S, appliquée au conjugué anti-complément, nous a permis les réactions d'immuno-fluorescence sur noyaux et surtout de supprimer les fausses réactions sur les tréponèmes.

III - LA CONJUGAISON

=====

Après la conjugaison les sérums marqués doivent subir divers traitements pour éliminer de nombreuses substances indésirables.

La dialyse élimine une partie des sels tampons utilisés dans la précipitation et dans la conjugaison, et de l'isothiocyanate de fluorescéine en excès.

Par contre, les molécules de fluorochrome hydrolysées, les substances fluorescentes qui peuvent accompagner ce fluorochrome, responsables d'une fluorescence non spécifique sur les préparations, ne sont même pas éliminées après une dialyse prolongée.

De nombreux procédés de purification ont été expérimentés. A l'heure actuelle, nous avons à notre disposition l'extraction sur poudre de charbon de bois et la filtration sur gel de "Dextrane" qui semblent donner les meilleurs résultats. (Séphadex).

Enfin, dans un dernier temps, il faut éliminer les protéines sériques conjuguées non anticorps, responsables d'une coloration non spécifiques (c'est-à-dire ne correspondant pas à la réaction AG/AC) due, semble-t-il à des forces électrostatiques entre la préparation et ces protéines. Celles-ci possèdent une charge négative (qui augmente avec la conjugaison) et se fixent sur les protéines tissulaires chargées positivement. On les élimine électivement en absorbant le sérum conjugué sur poudre d'organes ou par chromatographie sur LEAE-cellulose.

Nous allons examiner ces différents aspects de la fluorescence "dite non spécifique" et essayer de résoudre chacun d'eux.

1° - Elimination du colorant non conjugué aux protéines.

Cette élimination se fait en dialysant la solution de globulines conjuguées contre une eau saline tamponnée à pH 7,2 à +4°, en changeant le bain de dialyse 3 à 4 fois par jour. Cette opération a pour but d'éliminer l'excès d'isothiocyanate de fluorescéine. La dialyse est prolongée jusqu'à disparition totale de la fluorescence des eaux de dialyse à l'examen en lumière ultra-violette.

Le conjugué obtenu est centrifugé 15 mn à 6000 tours/minute. Ainsi préparé et purifié le conjugué peut être stocké à -20° en tubes maigres pendant plusieurs mois.

2° - Elimination de la "fluorescence non spécifique".

L'élimination de cette "fluorescence non spécifique" est un problème beaucoup plus sérieux et plus difficile à résoudre. Aussi de nombreuses techniques ont été proposées.

a) Poudre de charbon de bois activé ou "charcoal".

CHADWICK, NAIRN et Mac ENTERTON (15) ont employé le charcoal "charbon de bois activé", à raison de 2,5 mg par mg de protéines contenu dans le conjugué. On a une absorption du F.I.T.C. non conjugué, mais ceci est surtout valable pour les conjugués à la Rhodamine où il y a une grande quantité de fluorochrome non lié. Ceci a été confirmé par FOTHERGILL et NAIRN qui comparèrent l'absorption de cette "fluorescence non spécifique" sur charcoal et Séphadex G 25 (24).

b) Filtration sur poudre de Dextrane : Séphadex G 25

Le procédé le plus rapide est la gel-filtration sur Séphadex G 25 (33) (112). La même technique que pour le Séphadex G 200 est employée; ici une colonne de 15 cm sur 1 cm de diamètre suffit. Le Séphadex G 25 médium est un tamis moléculaire très réticulé ; il permet une séparation moléculaire chromatographique. On a une séparation des substances de faible poids moléculaire, ainsi on récupère le F.I.T.C. non fixé sur les globulines.

La séparation est très rapide, le F.I.T.C. reste en haut de la colonne tandis que le conjugué ^{est} récupéré au bas, en éluant avec le tampon pH 7,2. Le colorant est ensuite éliminé par lavage avec une solution de NaCl 2 M. Puis la colonne est équilibrée avec la solution tampon pH 7,2 ce qui permet son réemploi. Au bout d'une dizaine de passages la colonne doit être refaite. Le Séphadex est mis dans un bécher, lavé dans le tampon puis séché à l'alcool.

c) Absorption sur poudre d'organes

Cette absorption a pour objet de réduire la fluorescence non spécifique. Elle est classiquement réalisée par une ou plusieurs absorptions par de la poudre desséchée d'organes.

- Obtention de la poudre (18)

Nous faisons un pool de foies de cobaye qui peut être conservé à -20° au congélateur.

. Le foie est grossièrement coupé puis placé dans un mixer avec 50 ml d'eau physiologique pour 100 g d'organe.

. Les organes sont finement broyés avec un appareil tournant à 5000 tours/minute. Ainsi en quelques minutes on a une suspension homogène et très liquide.

. A cette suspension on ajoute 4 volumes d'acétone en agitant continuellement. On laisse reposer quelques minutes puis on décante et élimine le surnageant après centrifugation.

. On ajoute au culot de centrifugation une quantité équivalente de solution saline tamponnée et l'on procède à une nouvelle centrifugation à 4500 tours/minute pendant 5 mn. On répète 4 à 5 fois l'opération pour obtenir un surnageant pratiquement limpide.

. Le précipité ainsi lavé est remis en suspension dans un égal volume de solution saline tamponnée. A cette suspension on ajoute 4 volumes d'acétone en agitant.

. On laisse sédimenter à la température du Laboratoire puis on élimine le surnageant par décantation.

. On rajoute 4 volumes d'acétone puis on filtre le précipité sur Büchner.

. Le résidu est étalé et séché à 37°. On conserve la poudre sèche à +4°.

- Absorption

L'absorption se fait avec 100 mg de poudre d'organes par ml de conjugué dilué au 1/5 ou 1/10. Elle s'effectue préférentiellement à +4° pendant 12 heures. On peut également la réaliser à 37° pendant une heure en agitant de temps en temps le conjugué (49).

4° Association poudre d'organes et gel-filtration

Le procédé le plus efficace pour éliminer la plus grande partie de la "fluorescence non spécifique" est l'association de la filtration du conjugué sur Séphadex G 25 puis une absorption d'une nuit à +4° sur poudre d'organe, comme le préconise KIRSCH (52). De bons résultats ont été également obtenus par RIGGS et Collaborateurs (95) en filtrant et fractionnant les conjugués sur DEHE - Séphadex.

Les composés responsables de la fluorescence parasite sont éliminés par cette double filtration-absorption, ce qui a été vérifié par migration électrophorétique sur papier.

IV - L'AUTO-FLUORESCENCE =====

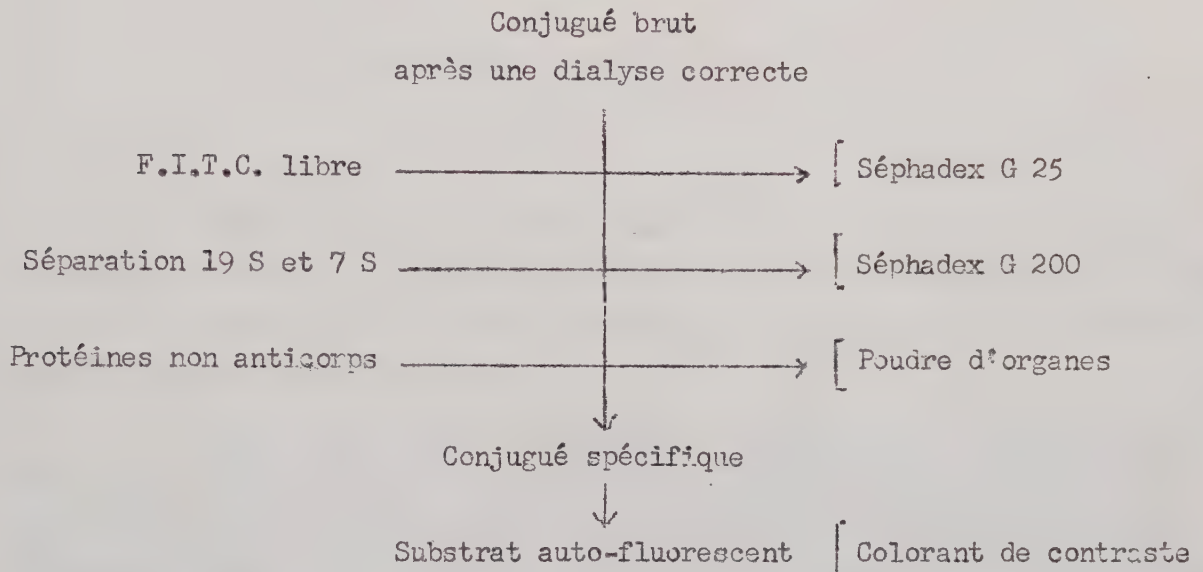
Pour l'étude des tissus et des cellules qui ont une auto-fluorescence indésirable il faut avoir soit des conjugués très spécifiques et de haut titre, ou bien utiliser des contrastants, ce qui permet d'utiliser valablement l'immuno-fluorescence.

Le premier contrastant que nous avons utilisé fut la Rhodamine RB 200 et la Lissamine Rhodamine conjuguée avec de l'albumine de boeuf (fraction V) (98). Le gros écueil pour son emploi est le temps de contact de 4 h. du conjugué sur la préparation. Nous obtenons une fluorescence rouge-orangée de contraste. Le second point est que cette fluorescence est très rapidement décroissante dans le temps sous l'action des ultra-violets. Mais l'avantage peut être un double marquage si l'on emploie deux anti-sérums différents l'un conjugué avec le F.I.T.C. et l'autre avec la Rhodamine RB 200.

CLAYTON utilisa le double marquage en un seul temps, en employant un immun sérum conjugué avec de la fluorescéine et de la Rhodamine RB 200 (16).

Le Bleu Evans fut employé pour éliminer l'auto-fluorescence des cellules infectées par un virus (84). Le Bleu Evans est employé au 1/10 000^e dans du tampon pH 7,2. Le temps de contact est de 10 mn (1). Il est employé à la fin de la réaction d'immuno-fluorescence. On trempe les préparations dans la solution de Bleu Evans pendant 10 mn, puis on fait deux lavages de 5 mn dans la solution tampon. La lecture ici encore doit se faire rapidement car exposé aux ultra-violets, le Bleu Evans perd sa qualité de contrastant. A l'heure actuelle il est également possible d'utiliser le "flazo-orange" pour masquer l'auto-fluorescence et la non-spécificité en I.F. (46).

Après avoir étudié les 4 points essentiels pour obtenir des conjugués utilisables quel que soit le substrat antigène, nous pouvons résumer les différentes opérations comme suit :



Si nous possédons un conjugué fait avec des immuno-globulines brutes, le premier temps sera une gel-filtration sur Séphadex G 25 pour éliminer le F.I.T.C. libre, puis nous fractionnons le conjugué sur Séphadex G 200 pour obtenir les fractions 7 S et 19 S. Le dernier temps sera l'absorption sur poudre d'organes choisi selon l'animal utilisé pour la préparation de l'antisérum ce qui permettra d'éliminer les protéines non anticorps sériques (20)(36)..

=====

DEUXIEME PARTIE

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre introductif, le but de notre travail est, en partie au moins, de vérifier et si possible de préciser la possibilité d'utiliser en pratique les conjugués anti-complément pour le diagnostic immunologique.

En fait ces essais d'utilisation pratique ont été menés surtout avec le souci de contrôler la qualité des conjugués obtenus. Nous devons souligner que notre objectif n'a pas été de réaliser un travail exhaustif consacré à telle ou telle application. Nous avons donc choisi trois secteurs d'applications pratiques situés dans des domaines différents de l'immunologie - auto-immunité, tréponématoses, virologie - et dans lesquels il n'avait été fait usage pratiquement de la méthode anti-complément jusqu'alors.

Nous allons donc maintenant exposer les résultats incomplets que nous avons enregistrés :

- dans la recherche des anticorps antinucléaires
- dans la recherche des anticorps antitréponémiques
- dans l'identification de certains virus.

CHAPITRE I

-=-

UTILISATION DES CONJUGUES ANTI-COMPLEMENT- RECHERCHE DES AUTO-ANTICORPS ANTINUCLÉAIRES -

La recherche des auto-anticorps antinucléaires est actuellement couramment mise en oeuvre pour assurer le diagnostic du lupus érythémateux aigu disséminé (LEAD). Parmi les nombreuses méthodes proposées successivement depuis la découverte des cellules L.E. par HARGRAVES - une trentaine au total - la méthode utilisant l'Immuno-fluorescence à deux couches, appliquée à des noyaux cellulaires, est assez employée et a fait l'objet de mises au point nombreuses.

Elle a été utilisée régulièrement depuis 1961 au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté, et c'est la raison pour laquelle nous avons choisi cette application pour évaluer la valeur du conjugué anti-complément.

Nous avons entrepris, par la suite, à côté de la recherche des auto-anticorps antinucléaires, chez des sujets lupiques, la production et la recherche des auto-anticorps chez des souris thymectomisées à la naissance. Cette production fut confirmée par l'emploi de l'I.F. indirecte et parallèlement de l'I.F. anti C'.

Ces résultats seront exposés dans trois parties :

. Dans la première partie, nous allons voir la technique et la mise au point de la méthode anti-complément pour la recherche des auto-anticorps antinucléaires.

. Puis, dans une deuxième partie, nous verrons la comparaison de la technique indirecte et de la technique anti C'.

. La dernière partie sera consacrée à la production et à recherche des auto-anticorps chez les souris thymectomisées.

I - TECHNIQUE DE LA METHODE ANTI-COMPLEMENT

A - Réactifs entrant en jeu dans la réaction

1°- Matériel nucléaire

Nous avons employé pour la recherche des anticorps antinucléaires des étalements de sang humain (59) et, d'autre part, des frottis de sang de souris parasité par *Trypanosoma Gambiense* qui permet de différencier les anticorps antinucléaires totaux, les anti-acide désoxyribonucléo-protéines (106), et les anti nucléo-histones.

L'emploi d'étalements de sang nous donne une richesse suffisante d'éléments, une morphologie facilement identifiable et une obtention facile. L'étalement est séché à l'air puis fixé dans l'acétone à -20° pendant 10 mn.

2°- Les sérums

Les sérums sont obtenus par ponctions veineuses. Après décantation ils sont conservés à -20° . Les sérums, avant leur emploi, sont décomplémentés 30 mn à 56° au bain-marie. Les sérums sont ensuite dilués au 1/2, 1/8, 1/64.. avec du complément dilué soit au 1/5, 1/10 ou 1/20. Le complément est dilué dans du tampon MAYER-KRAFT (1).

<u>Dilution finale</u>	<u>1/2</u>	<u>1/8</u>	<u>1/64</u>	<u>1/512</u>
Sérum pur décomplémenté	0,5	0,1	0,1	0,1
C' dilué	0,5	0,7	0,7	0,7

(1) Tampon Mayer-Kraft - Sol mère : ClNa 85 g - Véronal: 5,75 g -
Véronal sodique : 3,75 g.

Dissoudre l'acide dans 500 ml d'eau bidistillée. Compléter à 2000 ml. Ajouter Cl_2Mg : 1,60 g, Cl_2Ca : 0,28 g. Autoclaver 20 mn à 105° - Conservation à $+4^{\circ}$ - pH: 7,2. Au moment de l'emploi diluer au 1/5 en eau bidistillée.

3°- Conjugué fluorescent

Le conjugué anti-C' fluorescent est le conjugué C 105. L'immun sérum S 105 est obtenu par la méthode d'immunisation de BEUTNER modifiée.

Absorption du conjugué

Le conjugué est absorbé sur poudre d'organes pour éliminer la fluorescence parasite et non spécifique, comme le recommande JOHNSON (49). Nous avons fait les absorptions sur poudre de foies de cobaye préparée selon la technique de MEILLORS par extraction à l'acétone. Le conjugué est filtré sur membrane "millinore" de 45 μ après un contact avec la poudre d'organes d'une nuit à +4°.

B - Mise en oeuvre de la réaction

Nous avons employé la technique de BEUTNER (5), technique en 2 temps que nous avons reprise et appropriée à la recherche des auto-anticorps antinucléaires.

1°- Premier temps de la réaction : mise en contact du sérum à tester, dilué dans le complément, avec le matériel nucléaire.

Sur l'étalement de sang on délimite une aire circulaire au diamant, une goutte de sérum diluée dans le complément 1/10 est déposée sur chaque lame numérotée.

Le contact est maintenu pendant 45 mn à 37° en chambre humide. Le temps de contact terminé, on lave les lames 10 mn dans deux bains d'eau physiologique pH 7,2. On essuie soigneusement les lames autour de l'étalement délimité.

2°- Second temps de la réaction : fixation des globulines anti-complément marquées sur le complexe formé dans le premier temps AG/AC/C'.

Une goutte de conjugué fluorescent est déposée sur les étalements. On maintient le contact 30 mn à 37° dans les mêmes conditions que pour les sérums.

Le lavage et l'essuyage s'effectuent de la même façon que précédemment. Le montage se fait avec une lamelle montée sur la préparation avec une goutte de glycérine pH 7,0.⁽¹⁾

(1) Glycérine pH 7,0 :

C - Résultats

1°- Emploi du conjugué anti-C' absorbé sur poudre d'organes.

Nous avons fait la recherche des auto-anticorps antinucléaires avec le conjugué C 105 absorbé sur poudres d'organes. Avec ce conjugué total nous avons un manque de spécificité avec les sérums négatifs (tableau I)

2°- Emploi du conjugué fractionné sur Séphadex G 200.

Nous avons employé le conjugué fractionné sur Séphadex G 200. Nous avons testé les 5 fractions sur des sérums positifs et négatifs. Nous avons une bonne spécificité avec les fractions III et IV.

Tableau I. Tableau XIV Ière partie.

Le pool formé des fractions III et IV correspondant aux 7 S globulines, est reconcentré au volume initial du conjugué. Ce pool donne une spécificité parfaite et une sensibilité plus forte que le conjugué total. Avec le pool formé des fractions F III et F IV nous avons étudié la réaction anti-complément en immuno-fluorescence en faisant varier les dilutions du complément : C' 1/5 - 1/10 - 1/20.

D'après le Tableau I nous avons la meilleure fluorescence en employant le C' au 1/10. Pour chaque réaction nous avons fait des témoins avec du complément inactivé et, d'autre part, en employant le conjugué seul.

Quand le sérum est mal décomplémenté, une diminution du titre du sérum est notée. Ceci serait en rapport avec la compétition des deux types de complément vis-à-vis du complexe AG/AC. Il faut donc utiliser des sérums qui seront décomplémentés 30 mn à 56°C.

Pour la recherche des auto- anticorps antinucléaires par la méthode anti-complément en immuno-fluorescence, nous avons utilisé une technique à deux temps :

1°- sérum décomplémenté dilué dans le C' 1/10.

2°- conjugué fractionné sur Séphadex G 200 (F III - F IV).

Sérum	Dilution	C'	Conjugué	Résultats
Sérum LEAD K 5578 56° - 30 mn	1/8	1/5	C 105 F III + F IV	++
	1/64			++
	1/512			+ [±]
	1/8	C' inactif		-
	1/8 1/64 1/512	1/10		+++ ++++ +++
	1/8	C' inactif		-
	1/8 1/64	1/20		+ [±] +
Sérum LEAD non décomplémenté	1/8 1/64	C' 1/10		[±] +
Sérum négatif 56° - 30 mn	1/8 1/64	C' 1/10		- -
Sérum négatif 56° - 30 mn	1/8 1/64	C' 1/10	C 105 total	++ ++
Sérum LEAD 56° - 30 mn K 5578	1/8 1/64	C' 1/10	C 105 total	++ ++
	1/8		C 63	-
Sérum LEAD K 5578	1/8 1/64		C 63 1/20	++++ ++++
Sérum négatif	1/8 1/64			- -

C 105 : conjugué anti-complément

C 63 : conjugué anti-gamma globuline humaine

TABLEAU I

Comparaison de l'emploi de différentes dilutions du C' dans
l'utilisation de conjugué anti-C' pour la recherche d' A.C.
antinucléaires.

II - COMPARAISON DE LA METHODE ANTI-C' ET DE LA METHODE INDIRECTE EN IMMUNO-FLUORESCENCE.

A. - Rappel de la méthode indirecte

La méthode indirecte en I.F. pour la recherche des anticorps antinucléaires a été mise au point par Mlle A. KRATCHKO (59). Nous allons rappeler brièvement la mise en oeuvre de la réaction.

- Premier temps : Mise en contact de sérum à tester avec le matériel nucléaire identique à celui employé pour la méthode anti-complément.

- Le contact est maintenu 30 mn à 37° en chambre humide. Le lavage se fait en eau physiologique pH 7,2, puis on fait un essuyage soigneux.

- Second temps : Fixation des anti-globulines florescentes.

Le temps de contact du conjugué anti-gamma-globuline humaine est maintenu pendant 30 mn à la température du laboratoire. Ensuite nous avons le lavage, essuyage et montage de la préparation comme pour la méthode anti-complément.

B.- Installation optique

La pratique de l'I.F. demande un matériel optique particulier. Nous utilisons un microscope à fond noir Standard avec un dispositif binoculaire, excité par une source lumineuse à ultra-violets. Nous employons une lampe OSRAM avec un brûleur HBO 200 à vapeur de mercure. 3 filtres sont nécessaires :

- un filtre anticalorique KG 1 ZEISS
- un filtre d'excitation BG 12 ZEISS placé entre le système calorique et le microscope,
- un filtre protecteur dit d'arrêt : OG 1 ZEISS.

Ce même matériel nous a servi pour toutes les applications d'I.F. que nous avons réalisées.

C. - Interprétation du résultat

Nous avons fait les réactions sur des frottis de sang de souris parasités par du trypanosome. Ceci nous permet de différencier les anticorps antinucléaires totaux et les anticorps anti-ADN (106).

1° - Résultats négatifs

Les préparations traitées par un sérum négatif ne contenant pas d'anticorps antinucléaires, anti-ADN ou anti-histones, révèlent des hématies et des leucocytes se détachant de façon très nette. Le protoplasme apparaît légèrement fluorescent alors que le noyau s'inscrit au milieu véritablement en négatif.

2° - Résultats positifs

Les sérums qui possèdent des anticorps antinucléaires provoquent non seulement la fluorescence des noyaux des leucocytes mais éventuellement ceux des trypanosomes. Ces noyaux apparaissent alors très brillants au milieu du parasite. Dans certains trypanosomes on aperçoit en plus du noyau fluorescent des points brillants correspondants au kinétoplaste.

Avec les sérums positifs 3 réactions sont possibles :

- fluorescence isolée des noyaux de leucocytes - pas de fluorescence des noyaux de trypanosome : anticorps antinucléo-histones isolés.
- fluorescence des noyaux de leucocytes et de trypanosomes : anticorps antinucléo-histones et anti-ADN.
- fluorescence isolée des noyaux de trypanosome : interprétation discutée, le facteur responsable n'ayant pas la signification d'un anticorps et spécialement d'un auto-anticorps.

Ainsi, avec l'étalement du sang de souris parasité par *Trypanosoma Gambiense*, nous mettons en évidence les anticorps antinucléo-protéines sur les noyaux de leucocytes et les anticorps anti-ADN sur les noyaux de trypanosome.

DIAGNOSTICS	SERUMS TESTES	TECHNIQUES			
		Anti - C'		Indirecte	
LEAD	90	7	83	0	90
LEC	2	2	0	1	1
PCE	20	3	17	2	18
SCLERODERMIE	3	1	2	0	3
" SJOGREN	1	0	1	0	1
NEPHRITES	7	5	2	1	6
DIVERS	27	13	14	8	19
TOTAL	150	31	119	12	138
TEMOINS	50	50		50	
		-	+	-	+

TABIEAU II

Résultats comparés obtenus par la méthode I.F. indirecte
et la méthode I.F. Anti-C'.

3° - Analyse des résultats

Nous avons effectué sur 200 sérums positifs et négatifs parallèlement la réaction anti-complément et la réaction indirecte en I.F.

a) Résultats globaux qualitatifs

Ils sont rapportés dans le tableau précédent : tableau II.

Nous retrouvons une forte positivité avec les 2 méthodes pour les sérums de lupus érythémateux (LEAD)⁽¹⁾ et de polyarthrite chronique évolutive (PCE)⁽²⁾. Dans les sérums "divers" nous avons une nette négativité avec la méthode anti-complément par rapport à la méthode indirecte.

Le tableau des différents sérums positifs testés montre pour chaque sérum le titre des anticorps antinucléaires (AcN) et celui des anti-ADN (AcT) par les 2 méthodes en I.F.

Tableau III.

b) Analyse des différentes catégories d'affections testées

-- Le lupus érythémateux disséminé - (LEAD ou LED).

Nous avons testé 90 sérums provenant de 55 malades différents. Avec la méthode indirecte nous obtenons 100% de résultats positifs. Avec la méthode anti-complément nous avons 7 sérums négatifs bien que nous ayons un diagnostic de LEAD.

Nous donnons pour la méthode anti-C' et la méthode indirecte le titre des AC antinucléaires totaux (AcN dans le tableau III) suivi du titre des AC anti-noyaux de trypanosome (AcT dans le tableau III).

(1) - Lire désormais LEAD: Lupus érythémateux aigu disséminé

(2) - Lire désormais PCE : Polyarthrite chronique évolutive

1° - K 4902 Can..

- observation : LEAD discret - Evolution en LEAD -

Titre en anti-C'	:	0	-	0
Titre en indirect	:	64	-	0

Pour ce malade nous avons testé 4 de ces sérums à des temps différents de sa maladie. Nous trouvons :

K 4910 anti-C'	:	8	-	8
indirect	:	64	-	0
K 4940	:	64	-	0
	:	64	-	0
K 5799	:	64	-	0
	:	64	-	0

2° - K 4662 Mil..

- observation : LEAD -

Titre anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

3° - K 5427 Fer..

- observation : LEAD traité

Titre anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	+

4° - K 5812 Gan..

- observation : LEAD

Titre anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

Le sérum K 4965 nous donne le même titre en anti-C' et en indirect.

5° - K 4215 Lav..

- observation : Ce sérum est un LEAD en rémission.

Titre en anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

6° - K 5055 Fal..

- observation : LEAD discret -

Titre anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

-- La polyarthrite chronique évolutive - (PCE)

Nous avons testé 20 sérums. Les résultats se recoupent entre les deux méthodes.

Nous avons un seul sérum discordant entre les deux méthodes.

K 5523 Bar..

Titre anti-G'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

-- Maladies du Collagène.

Nous avons trois cas de sclérodermie. Les résultats sont superposables dans les deux méthodes.

-- Lupus érythémateux chronique - (LEC).

Notre étude a porté sur deux sérums que nous retrouvons négatifs avec la méthode anti-complément.

-- Maladies diverses.

Nous trouvons un très grand nombre de sérums provenant d'affections rénales (glomérulo-néphrite - néphryte - albuminurie - ...) d'affections pulmonaires, rhumatismales, virales...

1° - Affections rénales.

Nous avons testé 7 sérums donnés par 6 malades. 6 de ces sérums sont positifs en méthode indirecte, tandis que nous retrouvons deux sérums positifs avec la méthode anti-complément.

K 5544 Met..

Titre anti-C'	:	8	-	0
" indirect	:	64	-	0

K 5796 Met..

Titre anti-C'	:	64	-	0
" indirect	:	512	-	512

Avec ce malade, qui nous a donné 2 sérums, nous voyons une augmentation du taux d'anticorps antinucléaires révélés par les deux méthodes.

2° - Affections pulmonaires.

Pour un malade nous avons trouvé des AC antinucléaires dans les deux méthodes à un titre élevé. Lorsque la pleurésie fut guérie le taux d'anticorps était encore positif avec la méthode indirecte tandis qu'il se négativait avec la méthode anti-complément.

K 4624 Les..

Titre anti-C'	:	64	-	0
" indirect	:	1024	-	0

K 4711 Les..

Titre anti-C'	:	0	-	0
" indirect	:	64	-	0

3° - Affections rhumatismales.

C'est dans ce groupe d'affections que nous trouvons le plus grand nombre de fausses réactions que l'on n'élimine pas en employant l'I.F. anti-complément.

Nous avons testé 35 sérums par les deux méthodes. En I.F. indirecte nous obtenons 9 sérums négatifs sur noyau de leucocytes. En I.F. anti-complément nous avons 13 sérums négatifs.

Avec la méthode anti-complément on élimine de nombreuses fausses réactions dues aux affections virales, syphilitiques et maladies diverses telles que goutte, cirrhose, purpura...

On constate d'autre part que dans le LEAD ou PCE, on rencontre des titres supérieurs au 1/64è. Les réactions positives données par les affections rénales ou rhumatismales ont un titre égal ou inférieur au 1/64è, qu'il soit donné par la méthode indirecte ou anti-complément en I.F.

TABLEAU III

NOMS		Titre des AC par la méthode Anti-C ¹⁰⁵			Titre des AC par la méthode indirecte C62			Diagnostic clinique
		AcN	AcT	AcK	AcN	AcT	AcK	
K5578	GIRAUDIER	2048	64	64	2048	64	64	LEAD
K5146	LARIVOIRE	64	0	0	64	0	0	PCR
K5442	POUZOLS	1024	0	0	512	8	8	LEAD
K5128	GAY	64	0	0	64	0	0	PCE
K5397	PERRIN	32	0	0	64	0	0	PCR
K5421	BERGER	1024	8	8	2048	8	0	LEAD
K5275	GONNET	8000	1024	512	16000	512	512	LEAD
K5480	MELANDE	4096	128	0	16000	16000	16000	LEAD
K5529	BAUDET	512	128	64	16	1024	0	PCE
K4067	PCUZOLS	2048	512	128	2048	1024	512	LEAD
K5628	GONNET	1024	64	64	8000	8000	128	LEAD
K5522	BUY	4096	64	64	8000	512	512	LEAD
K5500	LAGILLIER	4096	64	8	4096	64	8	LEAD
K5258	PRUDHOMME	64	0	0	512	0	0	Divers
K5702	THYRODE	8000	4096	4096	16000	16000	16000	LEAD
K5631	SLAWER	64	0	0	512	8	0	Emphysème
K5588	SOULAGEON	8000	8000	8000	8000	64	0	LEAD
K5607	PESTRE	4096	64	64	8000	64	0	LEAD
K5757	SOULAGEON	512	512	512	512	512	512	LEAD
K5723	GONNET	2048	64	8	16000	512	512	LEAD
K5643	PERERA	64	0	0	512	64	0	Divers
K4996	MATEOSSIAN	1024	0	0	2048	0	0	LEAD
K4967	BARON	0	0	0	0	8	0	Glomérulo-Néphrite
K5036	KOLLER	4096	64	0	8000	64	8	LEAD
K5778	COMBIER	2048	0	0	4096	0	0	LEAD
K5775	CHARNAY	64	8	8	512	8	0	PCE
K5614	VIERA	512	64	0	512	512	0	LEAD
K5579	DUTHEL	8	0	0	64	8	8	PCE
K5565	VOILLOT	64	8	0	64	8	8	PCR
K5546	LOYER	1024	64	8	4096	64	8	LEAD
K5354	PERIERA	64	64	0	512	64	0	Divers
K5327	MAIGOSSIAN	4096	64	8	8000	512	512	LEAD
K5257	QUACCIA	1024	64	8	4096	64	8	LEAD
K5596	VALET	8	0	0	512	8	0	Sclérodermie
K5796	METTERY	64	0	0	512	512	0	Divers
K5332	RINALDI	8	0	0	512	64	0	PCR
K4013	POUZOLS	1024	512	0	2048	512	0	LEAD
K4443	DUVERNAY	4096	64	64	32000	64	0	LEAD
K4325	PERES	64	8	8	1024	8	0	LEAD
K4345	DUVERNAY	2048	1024	0	32000	4096	0	LEAD
K4376	LAVAL	8	0	0	512	1	0	LEAD Rémission

K5799	CANOVA	64	0	0	64	0	0	LEAD
K5764	KOLLER	64	0	0	512	8	0	LEAD
K5722	PASCUAL	64	0	0	1024	0	0	LEAD
K5568	BENLIAN	4096	64	64	4096	0	0	LEAD
K5536	SZMERIA	4093	0	0	8000	8	0	LEAD
K5540	GENTAZ	8	0	0	64	0	0	PCE
K5533	FERT	1024	0	0	1024	0	0	LEAD
K5528	GIDON	0	0	0	0	8	0	PCE
K5527	GRANGER	0	0	0	0	8	0	PCE
K5441	PASCUAL	512	0	0	1024	0	0	LEAD
K5453	ANDRE	1024	0	0	2048	8	0	LEAD
K5398	SAUNIER	1024	64	0	1024	512	0	LED
K5301	TZANEFF	1024	0	0	4096	1	0	LEAD
K5226	SZMERLA	4096	0	0	8000	8	0	LEAD
K5184	PRA T	4096	0	0	16000	0	0	LED
K5153	FON TORBE	64	0	0	512	0	0	LED
K5010	MANON	0	0	0	0	8	0	Divers
K5423	DESSAIN	0	0	0	0	8	0	Divers
K5351	POUGET	0	0	0	0	8	0	Divers
K5072	DAMIAN	8	0	0	64	0	0	Divers
K5109	MOIRE	8	0	0	64	0	0	Sclérodernie
K3801	PERES	64	0	0	512	0	0	LEAD
K4773	MILANDRE	512	0	0	1024	0	0	LEAD
K4624	LESTRA	64	0	0	1024	0	0	Divers
K4279	LACAZE	512	512	64	1024	0	0	LEAD
K4241	YRLES	512	64	8	1024	8	0	LEAD
K4201	DOSSANTOS	512	64	8	1024	64	0	LEAD
K3802	BERTHAIRE	64	0	0	512	1	0	LEAD
K3836	PRA T	1024	8	0	2048	0	0	LED
K4644	THEVENIN	2048	0	0	4096	8	0	LEAD
K4664	BATISTONI	1	0	0	64	0	0	LEAD
K8328	MARTINEZ	8	0	0	64	0	0	PCE
K4394	MEYER	0	0	0	64	0	0	Divers
K4835	VUILLAND	8	8	0	64	0	0	PCE
K4462	ROURE	8	0	0	64	0	0	LEAD
K4902	LANOVA	0	0	0	64	0	0	LEAD
K4232	BUTTIN	8	8	0	64	0	0	LEAD
K4177	FASSINO	8	0	0	64	0	0	LEAD
K4657	CHAVANNE	0	0	0	64	0	0	Divers
K4685	THYSEN	0	0	0	64	0	0	Divers
K4641	FARGERÉ	0	0	0	64	0	0	Divers
K4743	PEYRACHE	8	0	0	64	0	0	
K4106	TREYVE	64	0	0	64	0	0	LEAD
K4139	DUBOIS	8	1	0	64	1	0	LEAD
K5136	GRATALOUP	2048	0	0	16000	0	0	LEAD
K4940	CANOVA	64	0	0	64	0	0	LEAD
K4827	MORAND	64	0	0	512	0	0	Divers

K5798	CHABREDIER	4096	2048	2048	16000	1024	1024	LEAD
K5778	COMBIER	2048	1024	512	4096	0	0	LEAD
K5483	LAFOND	64	0	0	512	0	0	PCR
K5301	TZANEFF	512	0	0	4096	1	0	LEAD
K5361	PASCUAL	1024	0	0	1024	0	0	LEAD
K5732	COLIN	64	0	0	64	0	0	PCR
K5673	JOURDAN	64	0	0	64	0	0	Divers
K5649	DUMAS	0	0	0	64	0	0	Sclérodermie
K5760	LAFAY	1	0	0	64	0	0	Divers
K5544	METERY	8	0	0	64	0	0	Divers
K5545	VIVIAN	0	0	0	64	0	0	Divers
K5583	PARIS	8	0	0	64	0	0	Divers
K5362	LAMUILLERE	0			64	1		Divers
K5078	MOTTAZ	8			64			LED traité
K5427	FERRAND	0			64	4		LED traité
K5192	BERTINO	64			64			PCE
K5231	FOURNIER	0			64			Divers
K5248	Deila BLANCA	64			64			Divers
K5191	DESPRES	8			64			Divers
K5452	BOLLARD	8			64			PCE
K5464	EASTIDE	8			64			Divers
K5523	BARASSI	0			64			PCE
K5812	GAND	0			64			LEAD
K5820	MUNOZ	64	64	8	512	0	0	Divers
K5788	FENEYROU	0			0	8		Divers
K5761	SAVEY	0			0	8		LEC
K5937	GUILLAUME	512	8	8	1024	64	64	LEAD
K5269	MIALON	0	8	0	0	64	0	Divers
K6035	KOLLER	512	8	8	1024	64	64	LEAD
K6032	LOYER	512	8	8	1024	64	64	LEAD
K5995	YRLES	64	8	0	512	64	64	LEAD
K5970	PAGES	1024	64	0	2048	1024	0	LEAD
K5948	MORTIER	512			1024			LEAD
K5917	PASCUAL	512			1024	8		LEAD
K5913	THYRODE	512	64	8	1024	512	512	LEAD
K5820	MOUNCS	64	0	0	512	0	0	LEAD
K4196	VEIRA	64	64	64	64	0		LEAD
K3734	FERT	64	8	0	64			LEAD
K4215	LAVAL	0			64			LEAD
K5055	FALIP	0			64			LEAD
K5064	DUROT	8			64			LEAD
K4965	GAND	0			64			LEAD
K4910	CANOVA	8	8		64			LEAD
K4836	BUTIN	8			64			LEAD
K4711	LESTRA	0			64			Divers
K4326	REVEILLE	512			2048			PCR
K4404	THEVENIN	64			512			LEAD

K4175	ROLLER	64			512			LEAD
K4302	THEVENIN	64			512			LEAD
K4742	PASCUAL	8000	0	0	64000	0	0	LEAD
K4629	VADON	4096			16000			LEAD
K3843	FEPRAND	64	8	8	512			LEAD traité
K4144	DENONFOUY	0			512			LEC
K3535	DUROT	8			64			LEAD
K4700	THEVENIN	2048			4096	8		LEAD
K4606	FOREST	0			512			Divers
K4653	SOHLAY	8			512			LEAD
K5896	ASTIER	8	1	0	64	8	8	PCE
K5890	MARTILLAT	0	0		64			Divers
K5867	THIRIOT	0	0		0	8		Divers
K5868	REYNAUD	0	0		0	8		Divers

RESULTATS DES TITRES DES AC ANTINUCLAIRES DE 150 SERUMS SUR NOYAUX DE POLYNUCLEAIRES DE SANG DE SOURIS ET SUR NOYAUX DE TRYPANOSOME.

AcN Anticorps antinucléo-histones
 AcT Anticorps anti- A D N
 AcK Anticorps anti-kinétoplastes

D - Discussion

Nous allons maintenant discuter les 3 points qui nous permettront de juger cette réaction immunologique :

- la sensibilité
- la spécificité
- le reproductibilité.

1° - La sensibilité de la réaction

Il est fort possible que le taux des immun-sérums ne soit pas encore assez élevé car HINUMA (45) atteint un titre de 1 / 320 en inhibition de la fixation du complément.

C'est peut-être ce qui explique également l'absence d'anticorps antinucléaires dans le premier sérum de Can... (K 4902) et les 6 sérums négatifs en I.F. anti-complément tandis que l'on trouve un titre supérieur au 1/64 avec l'I.F. indirecte.

Mais la sensibilité de la réaction est quand même valable puisque l'on détecte des anticorps anti-ADN à un taux du 1/8 avec l'anti-C' tandis que la méthode indirecte ne décèle pas ses anticorps pour le sérum de Can... (K 4910).

Avec le sérum Les... (K 4711) nous avons une disparition des anticorps antinucléaires à la fin de la maladie tandis que la méthode indirecte les détecte encore.

2° - La spécificité de la réaction

Elle semble de spécificité meilleure que celle de l'I.F. indirecte. Elle supprime une quantité appréciable de fausses réactions données par les affections rénales, pulmonaires et rhumatismales.

3° - La reproductibilité de la réaction

Nous avons refait la réaction avec des sérums positifs et négatifs sur des frottis de sang humain et sur des frottis de sang de souris

parasité et non parasité. D'autre part, l'emploi de nouveaux conjugués anti-complément n'a pas amené de variation de titre des anticorps.

Au total, si l'on essaie de mettre en balance les avantages et les inconvénients de chaque méthode, il apparaît qu'à simplicité égale, la perte de sensibilité de la méthode anti-C' (7,7% contre 0% négatifs dans le LEAD) est largement compensée en gain de spécificité (18,8% contre 37% en dehors du LEAD).

III - UTILISATION DE I.F. INDIRECTE ET ANTI-C' POUR LA RECHERCHE DES AUTO-AC CHEZ LA SOURIS THYMECTOMISEE.

Nous avons entrepris à côté de la recherche des auto-anticorps antinucléaires chez des sujets lupiques, la production et la recherche des auto-anticorps chez des souris thymectomisées à la naissance (107).

De nombreux travaux ont été consacrés au rôle du thymus dans l'immunité et en particulier aux conséquences de la thymectomie pratiquée à la naissance. Après thymectomie apparaît chez la souris une maladie, la "runt-disease", maladie auto-immunitaire comparable en certains points au Lupus érythémateux aigu disséminé (LEAD) humain et à ses équivalents animaux (Sanis NZB).

Nous avons recherché les auto-anticorps ^{/anti-}nucléaires après plusieurs semaines chez des souris Swiss thymectomisées à la naissance.

A - Technique

1° - Technique de la thymectomie

a) Animaux thymectomisés.

Les souris utilisées sont des souris Swiss/Giff. Les souriceaux sont thymectomisés dans les douze premières heures après la naissance. Le souriceau est fixé sur une plaque de liège paraffinée, à l'aide d'un ruban adhésif et d'un anneau en caoutchouc maintenant la tête mobile.

L'animal est thymectomisé sans anesthésie - il est refroidi à $+4^{\circ}\text{C}$ avant l'ouverture aux ciseaux de la peau présternale et du sternum, sur une largeur correspondant au 2^e et 3^e côte. Les deux lobes thymiques sont aspirés à l'aide d'une pipette Pasteur dont l'extrémité coupée en biseau est d'un diamètre inférieur à 1 mm à l'extrémité.

Le souriceau est recousu par un point de catgut serti 00000. L'animal est rendu à sa mère une heure après.

b) Animaux témoins

Ce sont des animaux qui ont subi une thymectomie fictive (opération fictive de thymectomie).

Nous avons aussi des souriceaux normaux du même élevage.

2° - Technique de recherche des anticorps.

a) Prélèvement de sang.

Le prélèvement de sang se fait dans des tubes capillaires non héparinés, type employé pour le micro-hématocrite, par section de la queue de la souris. Les tubes capillaires sont fermés puis centrifugés. Le sérum est récupéré par section du tube au niveau de séparation des globules rouges et du sérum.

Les échantillons de sang sont prélevés à la 11^e, 15^e et 23^e semaine après la naissance.

b) Recherche des auto-anticorps antinucléaires.

- Technique indirecte.

Nous avons utilisé la méthode indirecte à deux couches. Le sérum est appliqué sur l'antigène pendant 30 mn à 37° en chambre humide. Dans le deuxième temps le conjugué lapin anti-gamma globuline de souris est maintenu 30 mn à la température ordinaire.

- Technique anti-complément.

Le sérum de souris est décomplémenté 30 mn à 56° puis additionné de sérum frais de cobaye dans la proportion de 1/10. Le sérum "activé" est maintenu sur l'antigène pendant 30 mn à 37° en chambre humide.

Le conjugué utilisé dans le 2^e temps est le conjugué anti-complément C 105 préparé selon la méthode de BEUTNER modifiée. Le pool utilisé est formé des

fractions III et IV après passage sur Séphadex G 200. Ensuite il est absorbé sur poudre d'organes une nuit à +4°C puis filtré sur "millipore" 45 µm. Le conjugué est appliqué 30 mn à 37°C en chambre humide.

c) Substrat.

Le substrat antigène sur lequel on a fait agir les sérums et le conjugué a été dans tous les cas du sang de souris infectées par Trypanosoma Gambiense qui permet de révéler à la fois des anticorps antinucléohistone et anti-ADN (74).

Le sang humain a été utilisé pour vérifier les anticorps mis en évidence dans les sérums de souris.

d) Réactions

Les réactions ont été exécutées de manière quantitative avec des dilutions du 1/4, 1/8, 1/16, 1/64, 1/128.

B - Résultats

1° - Les auto-anticorps antinucléaires en I.F. indirecte.

Les anticorps antinucléaires recherchés en I.F. indirecte sur sang de souris ont été mis en évidence chez :

14 souris thymectomisées	sur 31	après 15 semaines
20 "	"	" 26 après 23 "

Au contraire, 11 semaines après la thymectomie la recherche s'est avérée négative chez les 36 souris qui survivaient alors.

Chez les souris témoins faussement thymectomisées, nous avons 1 souris positive/12, et chez les animaux témoins normaux nous avons découvert 2 souris positives sur 34, ceci 23 semaines après la thymectomie.

Tous les résultats sont donnés dans le tableau IV.

Les titres donnés (l'inverse de la dernière dilution donnant un résultat positif) n'ont pas dépassé 4 pour les trois animaux témoins découverts positifs.

Titre	I.F. indirecte		Témoins		I.F. Anti-C'
			Thymectomie fict.	Tém. normaux	
1/1024		.			
1/512		- chaque point représente un animal positif -			
1/128		. . .			
1/64	. . .	. . .			.
1/16		. .			
1/8	. . .				. . .
1/4	. . .	. . .	.	. .	
Positifs	14	20	1	2	6
Négatifs	17	8	11	34	14
Total	31	28	12	36	20
Animaux thymectomisés après	11 semaines	23 semaines			23 semaines

TABLEAU IV

Evolution du titre des auto-A.C., chez des souris Swiss thymectomisées, mis en évidence par I.F. indirecte et par I.F. anti-C'

Souris		Titre I.F. indirecte		Titre I.F. Anti-C'
Cage	Numéro	23 semaines	26 semaines	26 semaines
5	6	256	1024	8 +++
6	3	64	512	8 ++
4	1	1024	2048	8 +++
	2	512	512	0
	3	128	512	8 ++
	4	512	512	64 +++
	5	128	1024	8 +++
1	3	8	8	0
2	2	8	8	0

TABLEAU V

Comparaison des titres des auto-A.C. par la
méthode I.F. indirecte et par la méthode
I.F. anti-C'.

Ils sont souvent beaucoup plus élevés pour les animaux thymectomisés, atteignant

8 et au-dessus pour la moitié des animaux positifs après 15 semaines
64 et au-dessus " " " " " 23 " .

2° - Auto-anticorps antinucléaires en I.F. anti-C'.

Les auto-anticorps antinucléaires ont été recherchés par la méthode anti-C' dans 9 sérums positifs et 11 sérums négatifs avec la méthode I.F. indirecte. Les 11 sérums négatifs ont été confirmés par la méthode anti-C'. Sur les 9 sérums positifs, 6 résultats positifs et 3 négatifs ont été obtenus.

Les titres exacts n'ont pas été évalués avec la méthode anti-C', tous les sérums étant testés à la dilution du 1/8.

Tableau V.

C - Discussion

1° - Ces résultats montrent que la thymectomie provoque l'apparition d'auto-anticorps antinucléaires chez un pourcentage élevé d'animaux survivants après quelques mois.

Les témoins ne présentent qu'exceptionnellement des anticorps et surtout la pratique de réactions quantitatives permet de constater des taux élevés et rapidement croissants.

2° - Les anticorps sont retrouvés par deux techniques différentes : I.F. à deux couches avec un sérum antiglobuline de souris marqué d'une part, et avec un sérum anti-complément marqué d'autre part, et sur deux substrats nucléaires différents.

De tels résultats n'avaient pu être antérieurement obtenus qu'en utilisant une technique d'I.F. à 3 couches, destinés à augmenter la sensibilité au prix d'une perte de spécificité rendant les résultats ininterprétables sur les sérums peu ou pas dilués (8).

3° - Le conjugué anti-C' a permis de confirmer la présence des antinucléo-histones fixés sur les noyaux de polynucléaires et l'on peut donc affirmer que les complexes antigène nucléaire - anticorps formés sont capables de fixer le complément. Mais il faut mentionner comme pour la recherche des auto-anticorps antinucléaires dans les sérums de sujets lupiques, la sensibilité de la méthode est inférieure à celle qu'utilise les conjugués antiglobu-

CHAPITRE II

- - -

UTILISATION DES CONJUGUES ANTI-COMPLEMENT- RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-TREPONEMIKES -

Au cours des quinze dernières années s'est produit un renouvellement fondamental de nos connaissances théoriques et pratiques de l'immunologie de la syphilis.

Nous disposons maintenant de nombreuses réactions pour réaliser un séro-diagnostic utilisable dans le diagnostic de la syphilis.

Ainsi la sérologie "classique" utilise des antigènes tissulaires, non tréponémiques qui sont des mixtures de cholestérol, lécithine et cardiolipides. Ces antigènes ont subi des perfectionnements mais n'ont pas une parfaite spécificité et sensibilité lorsqu'ils sont utilisés dans des techniques d'hémolyse ou de floculation.

Le test d'immobilisation des tréponèmes (T.P.I.) de NELSON et MAYER, est la réaction de référence. Elle possède une spécificité absolue vis-à-vis des anticorps tréponémiques, une reproductibilité excellente et une sensibilité incomparable par rapport aux réactions cardiolipidiques, mais une certaine difficulté technique ne permet son emploi que dans un laboratoire équipé convenablement.

Maintenant nous disposons comme antigène l'agent même de la maladie. Après diverses tentatives, telle que la réaction d'immuno-adhérence, ou la réaction d'agglutination du tréponème qui se révèlent décevantes, l'utilisation

de l'I.F. amenait la possibilité d'un diagnostic rapide et facile de la syphilis.

Cette réaction (F.T.A. Test)⁽¹⁾ a fait l'objet d'études précises comparatives et étendues (35) dans notre laboratoire, c'est pourquoi nous l'avons choisie comme seconde réaction de référence pour juger la valeur du conjugué anti-C⁺.

Nous avons donc appliqué la méthode d'I.F. anti-complément à la recherche des anticorps syphilitiques et nous avons recherché la correspondance ou la divergence des anticorps mis en évidence par cette technique et par la méthode indirecte en étudiant la variation du titre des anticorps pour certains sérums.

I - TECHNIQUE DE LA METHODE D'I.F. INDIRECTE

A - Mise en oeuvre de la réaction indirecte.

Le principe donné par DEACON se fait en deux temps.

1°) On réalise la formation du complexe AG/AC en apportant le sérum à tester au contact de l'antigène.

2°) On révèle le complexe par un sérum anti-gamma globuline humaine fluorescent.

Lorsque le sérum contient des anticorps il se fixe sur les tréponèmes et sont révélés par le sérum anti-gamma globuline conjugué avec le FITC qui les rend fluorescent (105).

S'il s'agit d'un sérum négatif, un des éléments est absent et la réaction fluorescente n'a pas lieu.

B - Matériel entrant dans la réaction .

1°) L' Antigène.

Il s'agit d'une suspension de tréponèmes, pathogènes, diluée

(1) - F.T.A. test - Fluorescent treponemal Antibody.

convenablement pour avoir un nombre suffisant de tréponèmes par champ optique. On dépose une goutte d'antigène dans les quatre emplacements contenus sur des lames porte-objet siliconées. La lame est séchée à 37° jusqu'à dessiccation, puis fixée à l'acétone à moins 20° pendant 10 mn.

2°) Sérum conjugué.

On recouvre l'étalement antigénique d'une goutte de sérum dilué au 1/200, 1/400 ... en eau physiologique pH 7,0 ⁽¹⁾.

Le temps de contact se fait pendant 30 mn en chambre humide à 37°. Après ce temps, où l'on prépare le complexe AG/AC, on lave les lames en eau physiologique à pH 7,2 pendant 10 mn.

On réalise le 2ème temps en mettant le conjugué fluorescent anti-gamma globuline absorbé sur poudre de foies de cobaye et de lapin. Le contact est maintenu 45 mn à 37° en chambre humide. On fait un nouveau lavage de 10 mn en eau physiologique, puis on monte la préparation avec une lamelle couvre-objet dans une goutte d'eau physiologique neutre.

3°) Lecture.

L'installation optique a été vue dans le chapitre précédent. Elle ne varie pas pour la lecture du tréponème.

Nous notons la fluorescence du tréponème comme suit :

0	pas d'ombre du tréponème	}	réaction négative
+	fluorescent non spiralé		
++	fluorescent spiralé	}	réaction positive
+++	très fluorescent		

On peut lire également tous les intermédiaires en donnant des demi-croix.

(1) Tampon pH 7,0 -	NaCl	6,8 g	
	PO ₄ HNa ₂ 2H ₂ O	1,48g	
	PO ₄ H ₂ K	0,43g	pour 1 litre d'eau distillée.

II - TECHNIQUE DE LA METHODE ANTI-COMPLEMENT

A - Mise en oeuvre de la réaction

Nous avons utilisé la technique de BEUTNER (5).

Nous l'avons employée sans modification pour la recherche des anticorps anti-tréponémiques.

Nous avons constaté avec le conjugué anti-complément une fluorescence faible par rapport à la technique du F.T.A. test. D'autre part, nous avons constaté une fluorescence non spécifique avec les sérums positifs pour des dilutions inférieures au 1/200. De plus avec les témoins négatifs nous obtenons une fluorescence égale à deux croix.

Ces constatations nous ont donc amené à étudier plus précisément certains éléments entrant dans la réaction.

Nous allons donc envisager l'étude de deux problèmes :

- Etude des facteurs secondaires.

Trois facteurs sont à étudier :

- pH de la réaction
- la température
- le temps de contact.

- Etude des facteurs de la non spécificité en I.F.

1° - Etude des facteurs secondaires

a) Conditions opératoires.

- le pH de la réaction : nous avons employé une eau saline légèrement alcaline de pH 7,2 (Tampon MAYER-KRAFT).

- la température de la réaction : elle se fait à 37° pour tous les temps de la réaction.

- le temps du contact du sérum et du conjugué : dans la réaction d'I.F. indirecte le temps de contact est de 30 mn. Ici on emploie le sérum dilué avec le complément ; nous avons essayé d'augmenter la fluorescence par

Protocole en 2 temps	Sérum + C' : 30 mn Conjugué : 30 mn	Sérum + C' : 60 mn	Sérum + C' : 90 mn
Sérum (+) + C' 1/10			
1/10	+	+	+
1/100	+	+ +	+ +
1/200	+ +	+ + +	+ + +
1/400	+ +	+ + +	+ + +
Sérum (-) 1/200 + C' 1/10	-	+	+
Sérum (+) + C' 1/20			
1/10	+	+ +	+
1/100	+	+ +	+
1/200	+ +	+ + +	+ + +
1/400	+	+ + +	+ + +
Sérum (-) 1/200 + C' 1/20	-	+ +	+ +

TABLEAU VI

Comparaison de l'intensité de l'I.F. Anti-C' en fonction
du temps de contact Sérum + C'.

prolongation du temps de contact du sérum.

Nous avons fait la réaction classique, en deux temps où le sérum dilué avec le complément est mis en contact sur l'antigène pendant 30 mn - 60 mn - 90 mn - puis dans un 2ème temps le conjugué est appliqué 30 mn. Toute la réaction se fait à 37° en chambre humide.

D'autre part, nous avons fait la réaction d'I.F. anti-complément en 3 temps :

- 1er temps : sérum
- 2ème temps : complément
- 3ème temps : conjugué.

Entre chaque temps nous avons fait un lavage avec de l'eau physiologique tamponnée pH 7,2. Dans cette technique nous avons fait varier le temps de contact du complément dans le 2ème temps de la réaction. Le temps de contact du sérum et celui du conjugué est de 30 mn.

b) Résultats.

Avec la technique en deux temps nous remarquons que la prolongation du temps de contact augmente l'intensité de la fluorescence. Le maximum est atteint pour un temps de contact de 60 mn. Mais il apparaît dans ces conditions une fluorescence non spécifique. Nous avons donc opté pour un temps de contact de 45 mn pour le sérum dilué dans le C' et de 30 mn pour celui du conjugué.

Dans une 2ème série d'expériences nous avons étudié la dilution favorable de complément. Nous avons pris des dilutions du C' au 1/10 et au 1/20 avec un temps de contact croissant de 30 mn - 60 mn - 90 mn.

Ayant éliminé le temps de contact supérieur à 60 mn car il nous donne une forte fluorescence non spécifique, nous examinerons l'utilisation du complément au 1/10 et au 1/20 dans la réaction fluorescente anti-complément.

D'après DEACON il faut que la dilution du sérum soit au 1/200 pour qu'un sérum soit positif en I.F. Dans les essais que nous avons pratiqués, le complément au 1/10 donne une positivité à 2 croix pour un sérum positif dilué au 1/200 et au-delà, tandis que le complément 1/20 ne donne qu'une fluorescence à 2 croix au 1/200 puis baisse d'intensité aux dilutions supérieures. (Tableau VI).

	Protocole en 2 temps		Protocole en 3 temps	Protocole en 3 temps
	Sérum + C' : 45 mn		Sérum : 30 mn	Sérum : 30 mn
	Conjugué : 30 mn		Complément : 30 mn	Complément : 30 mn
			Conjugué : 30 mn	Conjugué : 30 mn
Sérum (+)	1/10 +		++	+
C' 1/10	1/100 +		++	+ +
	1/200 + + +		+ + +	+ + +
Sérum (+)	1/10 +		++	++
C' 1/20	1/100 +		++	++
	1/200 + +		+++	+++
Sérum (-)	1/10 +		+	+
C' 1/10	1/100 +		++	+
	1/200 +		++	++
C' 1/20	0 -		-	-
Sérum (+)	1/200 -		-	-

TABLEAU VII

Comparaison de la spécificité de la réaction faite
en 2 temps ou en 3 temps.

Sérums	Dilution	Complément	Conjugué	Résultats
Sérum humain + Syphilis 56° - 30 mn	1/10	1/10	C. 105 Total	+
	1/100			+ +
	1/200			+ + +
	1/400			+ +
	1/800			+ +
Sérum humain -	1/10	1/10	C. 105 Total	+
	1/100			+
	1/200			+
Sérum humain + Syphilis 56° - 30 mn	1/10	1/10	C. 105 FIII - FIV	+
	1/100			-
	1/200			+ + +
	1/400			+ + +
	1/800			+ + +
Sérum humain -	1/10	1/10	C. 105 FIII- FIV	+
	1/100			+
	1/200			-

TABLEAU VIII

Comparaison de la spécificité de la réaction en utilisant
le conjugué anti-complément total ou fractionné sur
Séphadex G 200.

La technique réalisée en 3 temps nous donne encore des témoins négatifs non acceptables. Mais par contre nous avons un gain de fluorescence en utilisant le C' au 1/20. Le temps de contact de 30 mn ou de 120 mn dans le 2ème temps n'amène aucune différence de sensibilité pour la réaction (tableau VII).

c) Réalisation de la technique.

Après avoir étudié dans les facteurs secondaires l'influence du temps de contact : sérum, complément et conjugué, avec une technique en 2 ou en 3 temps, nous avons adopté le protocole suivant pour réaliser nos expériences :

- un pH pour la réaction de 7,2
- une température de 37° en chambre humide
- une technique en 2 temps
 - = sérum + complément : 45 mn
 - = conjugué : 30 mn

2° - Etude des facteurs de la non-spécificité

Dans ce chapitre nous allons rappeler l'étude que nous avons faite sur les facteurs de la non-spécificité en I.F.

Cette étude est de plus en plus importante. Nous avons vu dans la première partie les améliorations des conjugués après passage sur colonne de Séphadex G 200 et, par la même occasion, le gain de spécificité et l'augmentation de sensibilité amenés par les techniques nouvelles utilisées pour tenter d'éliminer la non-spécificité en I.F. (Tableau VIII - Tableau XIV 1ère partie)

B - Matériel entrant dans la réaction.

1° - Antigène

On emploie une solution de *Tréponéma pallidum* (Souche NICHOLLS) provenant d'une orchite précoce de lapin. L'antigène est fixé par l'acétone à moins 20° pendant 10 mn.

2° - Le conjugué anti-complément

Nous avons utilisé le conjugué C 105 anti-complément préparé par immunisation de lapin par la technique de BEUTNER modifiée : le conjugué est absorbé sur poudre d'organes. Puis nous avons employé le conjugué fractionné sur Séphadex G 200.

3° - Technique

On recouvre l'étalement antigénique d'une goutte de sérum à tester. Le sérum est dilué au 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 avec du complément au 1/5 et 1/10. On prépare le complément au 1/5 ou au 1/10 en le diluant dans du tampon MAYER-KRAFT.

Nous réalisons des dilutions suivantes :

<u>Dilution du sérum</u>	<u>1/10</u>	<u>1/100</u>	<u>1/200</u>	<u>1/400</u>	<u>1/800</u>
Sérum pur décomplémenté	0,05	0,05	0,2	0,2	0,2
Dilution du C'	0,45	0,45	0,2	0,2	0,2

On laisse le sérum en contact avec l'AG, préparé juste avant de mettre en cours la réaction, pendant 30 mn à 37° en chambre humide.

Après ce temps de contact on lave l'excès d'anticorps avec une solution saline tamponnée à pH 7,2 pendant 10 mn.

On essuie les lames autour des emplacements contenant le complexe AG/AC.

On recouvre d'une goutte de conjugué fluorescent anti-complément dilué en fonction de son titre. On laisse en contact 45 mn à 37° en atmosphère humide.

On rince et lave abondamment pour éliminer le conjugué. Puis on sèche les lames comme précédemment.

La préparation est montée sous une lamelle couvre-objet dans une goutte d'eau physiologique tamponnée.

C - Résultats

Dans le tableau IX nous avons les résultats comparés entre la méthode indirecte et la méthode anti-complément en I.F.

Sérum	Dilution	C'	Conjugué	Résultats
Sérum humain positif 56 ° - 30 mn	1/100	-	C 63 1/20	+
	1/200			+
	1/400			+
	1/800			+
Sérum humain négatif 56 ° - 30 mn	1/200	-	C 63 1/20	-
	1/400			-
Sérum humain positif 56 ° - 30 mn	1/100	1/5	C 105 F III + F IV	+
	1/200			+
	1/400			+
	1/800			+
	1/100	1/10	C 105 F III + F IV	+
	1/200			+
	1/400			+
	1/800			+
	1/200	inactif	"	-
	1/200			-
	1/200	1/10	C 105 F III + F IV	+
	1/400			+

C 63 Conjugué anti-gamma globuline humaine

C 105 Conjugué anti-C'

TABLEAU IX

Résultats comparés de l'utilisation de la méthode Anti-C' et indirecte dans la recherche des anticorps antitréponémiques.

Dans le tableau VIII nous donnons les résultats en utilisant le conjugué C 105 total, et les fractions FIII - FIV du même conjugué.

D - Discussion

Pour chaque essai avec la méthode anti-complément en I.F. nous avons mis des témoins positifs et négatifs connus. Nous avons également introduit dans la réaction du complément inactif et d'autre part utilisé un conjugué anti-gamma globuline humaine.

1° - Conjugué anti-C' absorbé sur poudre d'organes.

Dans les premiers résultats, nous avons obtenu, en employant le conjugué C 105 absorbé sur poudre d'organes, des réactions faussement positives.

Le conjugué C 105 est spécifique car avec du complément inactif la réaction d'I.F. est négative. Avec le complément seul il n'y a pas de réaction positive.

Le sérum négatif dilué au 1/100, 1/200 ..., donne une bonne spécificité d'après DEACON en I.F. indirecte. Il donne une réaction positive en I.F. anti-complément. Si nous diluons le sérum négatif au-delà du 1/800 ou en deçà du 1/100 nous gardons toujours une certaine positivité.

2° - Conjugué anti-C' fractionné sur Séphadex G 200.

Ce manque de spécificité n'a pu être éliminé que lorsque nous avons fractionné le conjugué sur Séphadex G200 et que l'on a employé les fractions FIII et FIV représentant les gamma-globulines 7 S. En employant les fractions FI et FII représentant les immuno-globulines 19 S et un peu de 7 S, nous retrouvons les réactions faussement positives.

Tableau VIII et X.V Ière partie.

E - Réalisation de la Technique anti-C'.

Pour la recherche en I.F. des anticorps anti-tréponémiques par la méthode anti-complément, nous utiliserons une technique en 2 temps :

- Premier temps: dilution du sérum dans du complément au 1/10.
Temps de contact : 45 mn en chambre humide.
- Deuxième temps: conjugué anti-C' fractionné sur Séphadex G 200
= F III + F IV.
Temps de contact: 30 mn en chambre humide.

III - RESULTATS COMPARES EN I.F. INDIRECTE ET EN I.F. ANTI-COMPLEMENT.

Nous avons testé 100 sérums sur lesquels nous avons une observation biologique et clinique.

Nous les avons classés dans 2 catégories.

- 20 sérums non syphilitiques
- 80 sérums syphilitiques que l'on peut répartir suivant le diagnostic fait aux différents stades de la maladie, en :

- syphilis primaire
- " secondaire
- " tertiaire
- " sérologique.

Tableau X.

A - Réaction qualitative en I.F. anti-C' et en I.F. indirecte.

Sur les 80 sérums testés nous avons 20 sérums, témoins négatifs que nous retrouvons négatifs par les 2 méthodes.

Dans les 60 sérums positifs nous voyons une baisse de sensibilité avec la méthode anti-C' par rapport à la méthode indirecte. Mais nous gagnons sur la lecture qui est facilitée car nous avons un fond presque sans fluorescence parasite.

6 sérums présentent une réaction négative (douteuse à +, ++̄) en I.F. Anti-C' et une réaction positive en I.F. indirecte.

TABLEAU X

Diagnostic	Sérums testés	Anti- C'		Indirecte		NELSON	
		-	+	-	+	-	+
Témoins négatifs	20	20		20		20	
Sérums positifs	80						
- quantitatifs	20						
Syphilis I	7		7		7	2	5
Syphilis II	13		13		13		13
- qualitatifs	60	6	54		60	5	55
Syphilis I	12	5	7		12	3	
Syphilis II	32	1	31		32	2	
Syphilis III	16	0	16		16	0	

Résultats comparés obtenus avec la méthode I.F. indirecte
et I.F. Anti-C' sur 100 sérums positifs et négatifs.

Il s'agit :

Sérum n° 20.337	Hav...	TPI 92%	Syph. I, II	Anti-C' +	FTA +++
21.593	Ben...	100%	II	+ -	+++
14.920	Hoe...	8%	I	+	+++
12.096	Gae...	87%	II	+ -	+++
21.215	Pac...	4%	I	+	+++
12.113	Main..	0%	I	+	+++

B - Réaction quantitative en I.F. anti-C'.

Nous avons fait une recherche quantitative des anticorps syphilitiques sur 20 sérums. Le titre est donné par l'inverse de la plus haute dilution qui donne encore une intensité de fluorescence égale à 2 croix. Cette étude quantitative a été réalisée sur les sérums de sujets syphilitiques traités et non traités.

Les titres obtenus, en réaction quantitative d'I.F. anti-C', sont en général inférieurs d'une dilution par rapport à l'I.F. indirecte.

La variation d'une dilution n'est pas significative, ainsi nous retrouvons pour 13 sérums sur 20 testés le même titre - un titre de 400 ou de 800 est à peu près équivalent et cet écart est pratiquement négligeable.

Avec la réaction quantitative nous pouvons juger de la qualité de la réaction, par des témoins de sensibilité et de spécificité adjoints à chaque protocole de réaction. Ainsi le C' inactif donne une réaction négative ainsi que le conjugué utilisé seul.

Les résultats obtenus font l'objet du tableau XI.

C - Etude de l'évolution des anticorps tréponémiques.

Classiquement, la sérologie de la syphilis utilise différents moyens pour révéler les anticorps syphilitiques dans les humeurs des malades, ceci par la mise en évidence :

- d'anticorps cardiolipidiques employés dans les réactions de fixation du Complément (B.W.KOLMER).

Sérums	Noms	Anti- C'	FTA test	Nelson	Diagnostic
22.261	Liob.	1600	6400	100 %	Syphilis II
22.114	Mer.	120.000	400.000	100	II
22.219	Hab.	200	400	35	I
21.709	Call.	400	800	96	II
21.740	Sab.	1300	6400	100	II
20.969	Col.	1600	3200	13	I
21.037	Scho.	1600	6400	96	II
21.094	Bert.	800	3200	52	I
21.198	Barr.	400	1600	100	II
20.932	Four.	3200	6400	100	I
20.932 ⁴	Four.	200	400	100	II
18.015 ⁷	Cab.	200	400	100	II
18.037 ⁸	Mar.	6400	12800	100	II
21.474	Vad.	400	800	100	II
17.018 ¹⁰	Mad.	800	1600	100	II
34.374	Mar.	800	1600	100	I
20.969	Sab.	800	1600	100	II
18.208 ³	Arn.	1600	3200	100	I
20.776	Bro.	400	1600	16	I
22.261 ²	Liob.	6400	12800	100	II

TABLEAU XI

Comparaison des titres des sérums positifs par la méthode
I. F. indirecte et I. F. anti-C'.

- d'anticorps tréponémiques employés dans les réactions de flocculation.
- d'anticorps immobilisants utilisés par la réaction de NELSON.
- d'anticorps mis en évidence par l'I.F.

Ces anticorps apparaissent au cours de la maladie, à une période différente et permettent de connaître l'évolution de l'infection. Nous avons suivi les variations du titre des anticorps mis en évidence par la méthode d'I.F. indirecte et par la méthode d'I.F. anti-C' sur plusieurs sérums.

Nous avons testé 4 sérums en ayant en moyenne 8 prélèvements de sang étalés sur une année. Nous avons titré quantitativement chaque sérum par la méthode indirecte avec un conjugué anti-gamma globuline humaine dilué au 1/20 et par la méthode anti-C' avec le conjugué C 105 fractionné sur Séphadex G 200.

1° - Résultats.

Tableau XII et courbes correspondantes.

2° - Discussion.

Nous remarquons, si nous traçons la courbe de montée des anticorps syphilitiques révélés par la méthode indirecte et par la méthode anti-C', que les 2 tracés pour un même malade ne se recoupent pas.

La courbe des anticorps mis en évidence par le conjugué anti-complément est comprise dans celle des anticorps mis en évidence par la méthode à double couche.

On n'a pas mis en évidence d'autres anticorps par la méthode anti-C'. Nous avons simplement mis en évidence une certaine fraction de ceux mis en évidence par la méthode indirecte qui nous donne la valeur globale des anticorps fluorescents.

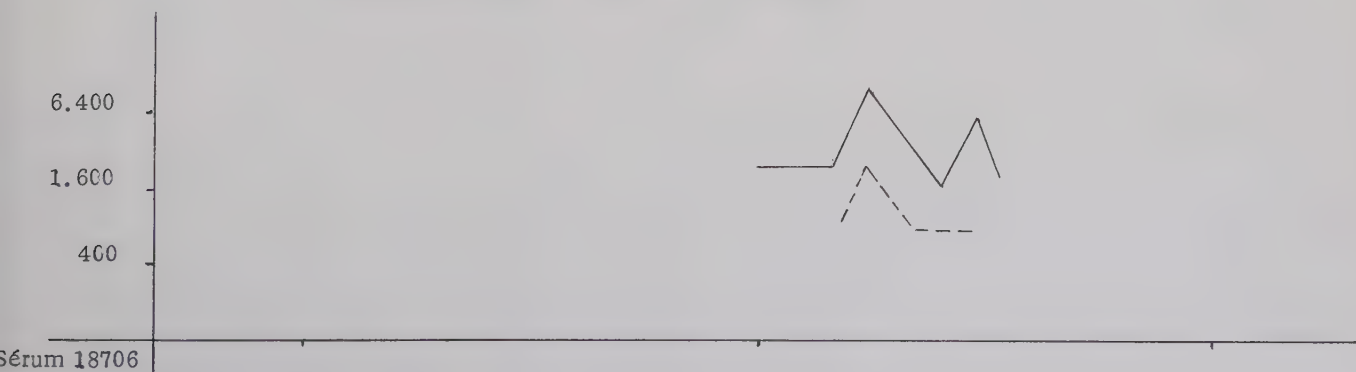
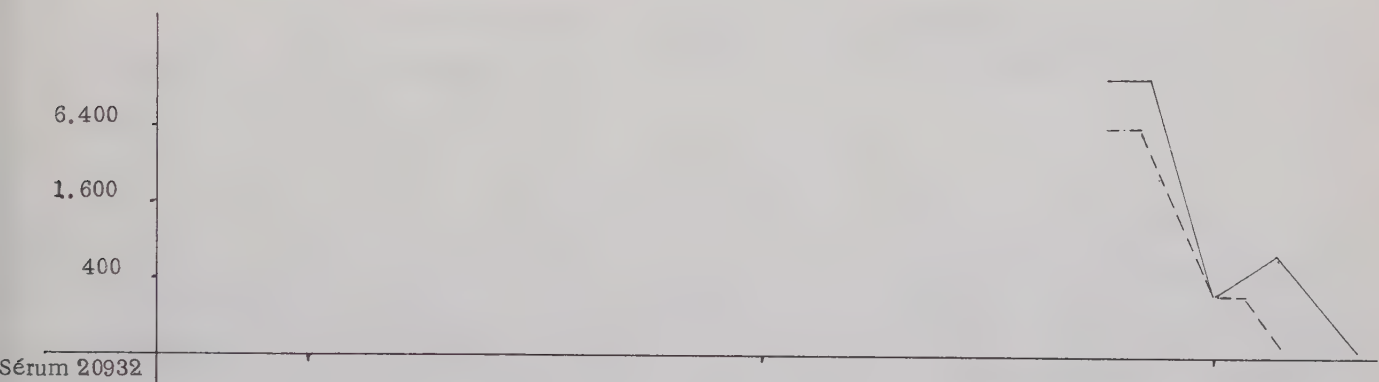
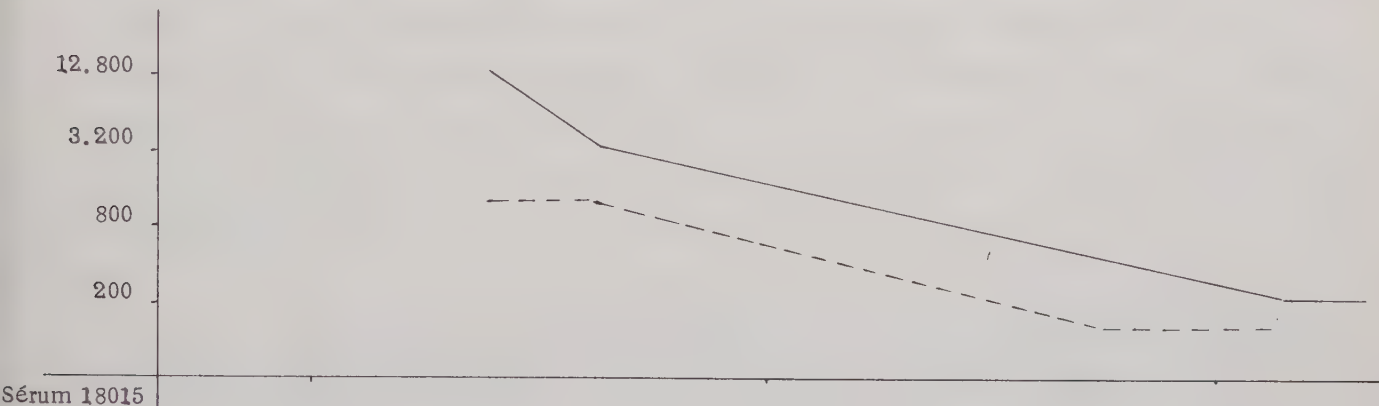
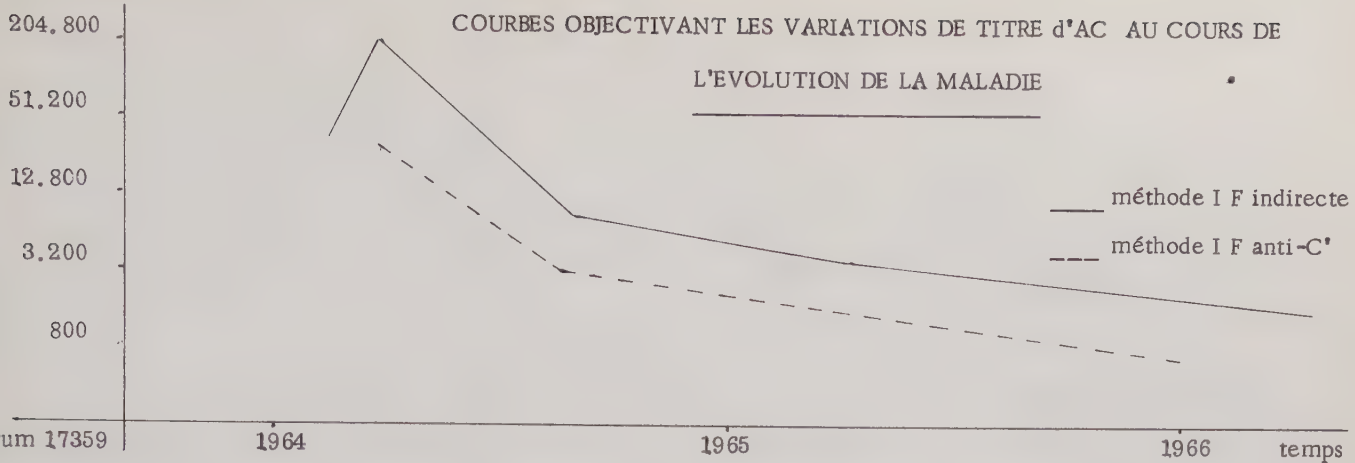
Sérum	Date	Sérologie			Nelson	I. F. indirecte	I. F. Anti - C'	Diagnostic
		BW	Kh	K1 ^x				
N° 17359	5.3.64	2	4	4	100			Condylome Syphilis II
	5.3.64					102400		
	Mars 64					204800	25 600	
	17.3.64					102400		
	24.3.64					51200	6 400	
	12.6.64					25300	6 400	
	13.10.64							
	1.12.64							
	11.2.65					12800	1 600	
	23.6.66					6400	800	
N° 18015	30.5.64	2	4	4	100			Syphilis II
	30.5.64					12 800	1 600	
	20.8.64					3 200	1 600	
	6.11.64							
	4.1.65					1 600	800	
	1.4.65					800	400	
	16.9.65					800	200	
	16.2.66					400	200	
	22.4.66					400	200	
N° 20932	30.10.65		4		82			Syphilis II
	30.10.65					6 400	3 200	
	15.11.65					6 400	3 200	
	1.12.65					1 600	800	
	21.12.65					200	200	
	4.2.66					400	200	
	6.4.66				45	200	0	
	15.6.66				0	0	0	
N° 18706	10.10.64							Chancre I Guérison Recontamination
	10.10.64	2	4	4	48		1 600	
	12.12.64	0	0	0	0			
	6.2.65	2	4	4	100	1 600	800	
	6.3.65					6 400	1 600	
	7.4.65					1 600	800	
	5.5.65					800	800	
	15.5.65					3 200	400	
	16.6.65					800	400	

x - Réactions sérologiques : BW(Bordet-Wassermann) - K_h (Kahn) - K₁ (Klein)

TABLEAU XII

Titres en AC syphilitiques révélés par la méthode I. F.
indirecte et anti-C'.

titre des AC



D - Conclusion

La méthode d'immuno-fluorescence anti-C' appliquée au diagnostic de la syphilis, malgré son intérêt, ne peut être employée actuellement comme une réaction de routine, mais elle doit posséder trois qualités :

1° - La spécificité :

La spécificité aux faibles dilutions n'est pas absolue, ceci est également vrai pour l'I.F. indirecte. La dilution de base doit être de 1/200 (FTA 200) pour éliminer, en principe, la fluorescence non spécifique. Si on fait agir un sérum pur ou dilué au 1/10 sur les tréponèmes on observe fréquemment une positivité due à la fixation d'AG non tréponémique et de matière indéterminée. Nous avons grandement amélioré cette non spécificité en fractionnant les conjugués anti-C' sur Séphadex G 200.

2° - La sensibilité :

Nous avons une hyposensibilité avec la méthode anti-C' ; ceci semble dû aux conjugués préparés avec des immun-sérums de titre faible.

Nous observons avec le conjugué anti-complément une facilité de lecture de la fluorescence, car nous avons un fond très propre et sombre sur lequel se détache bien le tréponème.

3° - La reproductibilité :

La réaction possède une reproductibilité quasiment parfaite si nous utilisons des conjugués anti-C' fractionnés sur Séphadex. Nous avons toujours retrouvé des résultats semblables. Nous avons seulement constaté des variations de l'intensité de la fluorescence, ceci étant dû à l'impossibilité de posséder des réactifs irréprochables, tel que l'antigène.

CHAPITRE III

-2-

UTILISATION DES CONJUGUES ANTI-COMPLEMENT- RECHERCHE EN VIRCLOGIE -

La recherche des virus à partir des prélèvements doit être conduite avec une grande rapidité pour répondre au désir des cliniciens et des épidémiologistes soucieux de préciser au plus tôt l'étiologie d'affections virales.

Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode rapide de recherche des virus par la mise en culture sur cellules de virus contenus dans des produits biologiques.

L'emploi de l'I.F. peut permettre de déceler la présence d'un virus dans une cellule avant même qu'apparaissent les lésions ou effets cytopathogènes (E.C.P.)⁽¹⁾ visibles au microscope optique, et de rendre possible la détection du virus en même temps que son identification précise ou tout au moins à une espèce.

Nous avons utilisé et comparé les méthodes d'I.F. directe, indirecte et anti-complément pour la recherche des virus ou des antigènes viraux.

Nous exposerons dans une première partie les modalités techniques des trois méthodes, puis dans la seconde partie les applications pratiques que nous avons pu réaliser au laboratoire de virologie du Professeur SOHIER.

(1) - Lire désormais pour E.C.P. : effets cytopathogènes.

I - MODALITES TECHNIQUES

A - La méthode directe dite "à une couche".

Dans cette méthode la révélation du complexe antigène-anticorps se fait comme suit :

- Couplage d'une gamma-globuline anticorps spécifique avec un fluorochrome aboutissant à la formation d'un conjugué.
- Mise en présence de l'antigène spécifique correspondant et du conjugué qui fait apparaître une fluorescence à l'endroit où le virus commence à se multiplier.

B - La méthode indirecte dite "à deux couches".

La technique ici est la suivante :

- Couplage d'un sérum anti-gamma globuline avec un fluorochrome.
- Formation d'un complexe AG/AC globuline.
- Révélation de ce dernier par le sérum anti-gamma globuline fluorescent.

Ces deux méthodes nous ont permis la recherche et la mise en évidence de nombreux virus que nous avons pu comparer avec la 3ème méthode indirecte dite "anti-complément".

C - La méthode indirecte dite "Anti-complément".

Cette méthode fait intervenir successivement :

- L'immun-sérum additionné de complément de cobaye
- Formation du complexe antigène-anticorps fixant le complément.
- Révélation de ce dernier par un sérum anti-C' fluorescent.

Ainsi, la technique d'I.F. avec ses 3 méthodes permet actuellement soit l'identification d'un virus en vue du diagnostic direct, en faisant appel à la méthode directe, soit le diagnostic immunologique indirect pour la recherche des anticorps spécifiques présents dans le sérum du malade, par la méthode indirecte ou la méthode anti-C'.

II - APPLICATIONS PRATIQUES

A - Immuno-fluorescence en couche directe

Nous avons utilisé une méthode rapide de recherche du virus vaccinal, par la mise en culture sur cellules du virus contenu dans les produits biologiques, et son identification avant l'apparition des lésions cellulaires, par I.F. en couche directe (60).

La technique de recherche par l'I.F. à une couche a été étudiée par MURRAY (81) et KIRSH (52).

Le principe et la réalisation en sont simples. Les frottis des lésions suspectes sont traités par un sérum animal ou humain anti-vaccine de titre élevé, conjugué avec le F.I.T.C. Les cellules infectées présentent une fluorescence cytoplasmique traduisant la présence d'un matériel antigénique du groupe vaccine-variole.

1° - Matériels

a) Prélèvements.

Nous remercions ici le Dr. R. NETTER qui nous a aimablement donné le liquide de pustules cutanées de lapin titrant $3,15 \times 10^7$ par ml avec la technique de formation de plaques (P.F.U.)⁽¹⁾

b) Culture sur cellules.

Les cellules utilisées sont des cellules T maintenues en lignée continue et cultivées sur lamelle en tube de Barski, à raison de 60 000 cellules par tube. Après 48 heures de culture en milieu de Hanks au sérum de veau, le milieu est rejeté et on introduit dans chaque tube 0,5 ml de dilution, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} de produit virulent (souche Listère). Le contact est maintenu une heure à 37° . On ajoute 0,5 ml de milieu de Hanks au liquide amniotique. Les tubes sont conservés à 35° au minimum 16 heures et au maximum 36 heures.

La même technique a été utilisée avec des cellules Hela et des cellules de reins de singe.

(1) - P.F.U. : Plaque forming unit.

2° - Technique directe en I.F.

Après ce délai le milieu est rejeté. Les lamelles sont prélevées et fixées dans un bain d'acétone à moins 20°, directement sans rinçage, pendant 10 mn puis elles sont séchées à l'air. Elles sont conservées à -20° jusqu'à l'usage.

a) Principe

Sur chaque lamelle est déposée une goutte de gamma-globuline de lapin anti-vaccine conjugué avec du FITC. Le contact est maintenu une heure à 37° en chambre humide. L'excès de colorant est rejeté; les lamelles sont lavées en eau physiologique tamponnée à pH 7,2 pendant 10 mn. Les lamelles sont montées dans une goutte de glycérine tamponnée, sur une lame-porte-objet servant de support.

b) L'antisérum fluorescent

L'anti-sérum conjugué fluorescent est un sérum de lapin immunisé contre la vaccine, par scarifications multiples et injections intra-musculaires et suivi d'injections intraveineuses. Ce sérum possède un titre de 50% . 10⁻⁵ par la technique d'inhibition de la formation de plages sur cellules Héla.

Après séparation des anti-gamma globulines par relargage, elles sont conjuguées avec le FITC se on la technique décrite par NATHAN (63) et MARSHALL (70). Le conjugué est utilisé dilué au 1/10. Avant son emploi il est absorbé sur poudre d'organes pendant une nuit à +4° puis filtré sur millipore 45 µm après centrifugation à 6000 t/mn pendant 10 mn.

3° - Résultats

Il faut d'abord préciser les conditions d'interprétation de la recherche du virus dans les cultures de cellules par la méthode d'I.F.

Le virus vaccinal se développe rapidement en moins de 6 h et son cycle de développement est essentiellement cytoplasmique. Lorsque le produit pathologique ensemencé est virulent, un nombre variable de cellules apparaît, après coloration par le conjugué fluorescent, contenir des inclusions arrondies, de taille variable, à prédominance juxtanucléaire cytoplasmique .

Ces inclusions sont rendues par le FITC d'une fluorescence jaune verte très brillante qui contraste parfaitement avec le noyau de la cellule et le cytoplasme des cellules non infectées qui possèdent une faible fluorescence.

Au faible grossissement on repère facilement les plages jaunes vertes fluorescentes infectées qui se détachent très lisiblement sur un fond plus sombre non lumineux.

B - Immuno-fluorescence à double couche

La méthode indirecte, en employant un conjugué anti-gamma globuline humaine, nous a permis de révéler de nombreux virus.

Dans un premier temps le sérum contenant des anticorps vis-à-vis d'un virus est appliqué sur un antigène spécifique. Le complexe AG/AC est révélé dans un deuxième temps par le conjugué anti-gamma globuline.

Nous avons étudié les virus suivants :

- Poliovirus
- Myxovirus influenzae B
- Virus de l'Herpès
- Virus respiratoire syncytial.

I - Poliovirus

1° - Culture sur cellules.

On emploie des cellules de reins de singes Vervet trypsinées. On ensemece les cellules dans des boîtes de Roux. Après quelques jours, elles sont mises en culture en tube de Barski. Les tubes sont inoculés avec le virus lorsque l'on a une culture de 60.000 à 80.000 cellules par tube.

Après 48 heures de culture en milieu de Parker additionné de 2% de sérum de veau, le milieu est rejeté et l'on introduit le poliovirus I, II, ou III (souche Sabin) aux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} . On met dans chaque tube 0,200 ml de virus dans 1,8 ml de milieu de survie type Parker.

Les tubes sont mis à l'étuve à 37° pendant 24 heures ou jusqu'à l'apparition d'un début ECP.

2° - Prélèvement.

Les lamelles sont prélevées des tubes, puis directement fixées à l'acétone à -20° pendant 10 mn. Elles sont séchées à l'air puis elles sont déposées sur des lames porte-objets numérotées.

3° - Réaction.

On emploie un sérum humain hyperimmunisé source d'anticorps. Le conjugué est un sérum anti-gamma globulines humaines marqué au FITC. La réaction a été faite également avec des sérums de singes hyperimmunisés et un conjugué anti-gamma globulines de singe. Avant son emploi le conjugué est absorbé une nuit à $+4^{\circ}$ sur poudre d'organes puis passé sur Séphadex G 25.

- 1er temps : Le sérum humain est mis en contact sur la lamelle pendant 30 mn à 37° en chambre humide. Après le contact les lamelles sont lavées en eau physiologique tamponnée à pH 7,2 dans des tubes de Kahn.

- 2ème temps : On sèche les lamelles puis on met immédiatement le conjugué employé au 1/20. Après un contact de 30 mn à la température du Laboratoire les lamelles sont lavées 10 mn pour éliminer le colorant. Les lamelles sont montées avec un tampon glycéro à pH 7,0 sur des lames numérotées.

4° - Résultats.

Les cellules infectées par le Poliovirus montrent une fluorescence granuleuse dans le cytoplasme autour du noyau. Certaines cellules possèdent une fluorescence diffuse autour du noyau (10).

La réaction réalisée avec les 3 types de Poliovirus s'avère ininterprétable car il y a une interférence croisée entre les 3 types d'anticorps.

II - Virus respiratoire syncytial (virus R.S.).

1° - Culture sur cellules et prélèvements

Les cellules utilisées sont des cellules KB maintenues en lignée continue. Elles sont inoculées avec du virus R.S. souche américaine Long. On introduit dans chaque tube de Barski 0,15 ml de virus pur, dilué dans 2 ml de milieu de survie, type Eagle. Au bout de 5 jours, l'ECP est de deux croix (50%). Nous avons fait une deuxième série de cellules inoculées avec le même virus mais que nous avons pris avec un ECP à une demi-croix au bout de 2 jours.

La fixation des lamelles se fait dans un bain d'acétone à -20° pendant 10 mn.

2° - Réactions

On emploie un sérum humain de référence titrant 1/512 en fixation du complément. Il est dilué au 1/10, 1/20, ... 1/100 en eau physiologique tamponnée à pH 7,2. Le conjugué anti-gamma globulines est utilisé au 1/20 dans la réaction.

3° - Résultats

Nous retrouvons la formation de syncytium caractéristique avec 4 à 5 noyaux autour d'une masse amorphe centrale. Les lésions paraissent essentiellement cytoplasmiques. Les noyaux sont non altérés comme le révèle la technique d'I.F. par la méthode indirecte. Il faut employer des cellules qui n'ont pas trop souffert, c'est-à-dire qui ont un ECP à une demi-croix ou une croix pour pouvoir bien interpréter le changement amené par le virus dans le cytoplasme. Ainsi il a pu être montré l'apparition rapide du virus dans le cytoplasme.

III - Myxovirus : grippe B.

1° - Préparation des cellules.

Nous avons utilisé des cellules de reins de singe (Mervet), cultivées dans le milieu de Parker. Le milieu de survie est additionné de sérum anti-SV 5, pour neutraliser la pousse du virus SV 5 qui parasite souvent le singe.

Au bout de 3 à 5 jours d'incubation, lorsque les lamelles de Barski ont une couche mono-cellulaire de $6 \text{ à } 8.10^4$ cellules, nous faisons l'inoculation du virus de la grippe B.

Quand l'ECP apparaît dans les cellules infectées, les lamelles sont directement fixées à l'acétone à -60° pendant une minute, sans lavage à l'eau physiologique. Nous avons fait deux séries d'ensemencements de virus de la grippe B :

- Grippe B (GARIOUD): on inocule 0,1 ml de virus dans 1,5 ml de milieu de Parker. Il nous donne un ECP à 2 croix, 4 jours après l'inoculation.

- Grippe B (GRAND) : on inocule dans les mêmes proportions, mais il ne donne qu'un ECP à 1 croix après 4 jours d'incubation.

2° - Réactions.

L'immun-sérum humain de référence titre 1/256 en FDC' pour le myxovirus de la grippe B. Il est dilué en eau physiologique pH 7,2 aux dilutions voulues ainsi que le conjugué anti-gamma globulines humaines qui est utilisé au 1/20^è.

3° - Résultats.

Au petit grossissement nous voyons 30% à 50% des cellules infectées. La méthode I.F. indirecte révèle l'antigène dans le cytoplasme et non dans le noyau. Les particules virales du myxovirus rendues fluorescentes par le conjugué anti-gamma globuline se retrouvent dans le cytoplasme et juxta-nucléaire formant une couronne fluorescente autour du noyau.

IV - Herpès virus.

1° - Culture sur cellules.

On cultive le virus herpétique sur cellule de rein de singe (Vervet) en tubes Barski. On introduit dans chaque tube 0,1 ml de virus pur dilué dans 1,9 ml de milieu de survie Parker, lorsque nous avons une culture mono-cellulaire suffisante, appréciée au microscope optique.

Au bout de 24 heures l'ECP 50% est à une croix, 48 h après il est à deux croix. Nous avons utilisé ces cellules infectées après fixation à l'acétone à -60° pour la recherche des anticorps sériques par la méthode indirecte.

2° - Réactions.

On a utilisé un sérum humain titrant 1/128 en FDC' qui est dilué en eau physiologique du 1/10 au 1/100. Le conjugué anti-gamma globuline dilué au 1/20 est absorbé sur poudre d'organes et filtré sur Séphadex G 25.

3° - Résultats.

Au petit grossissement les cellules sont infectées entre 50% et 80%. Nous avons des plages de 4 à 5 cellules fluorescentes se détachant nettement sur un fond de cellules non infectées.

Au fort grossissement, les cellules ne donnent pas de dégénérescence. Les particules virales fluorescentes se retrouvent dans le cytoplasme. Nous avons aussi dans certaines cellules une masse en croissant fluorescente cytoplasmique. Le noyau n'a pas été vu infecté par le virus car il n'apparaît aucune fluorescence intérieure.

C - Immuno-fluorescence par la méthode anti-complément.

C'est dans la recherche virologique que la méthode anti-C' en I.F. a permis le plus d'applications.

HULIER et KLEIN (76) démontrèrent la fixation du complément par la méthode anti-C' fluorescent, sur des cellules de tissu infecté par des entérovirus tels que ECHO 9 et Polio I (Type Mahoney).

HINUMA et HUMMELER (43) ont obtenu des résultats satisfaisants avec des anti-sérums anti-C' humains ; ils ont obtenu des résultats spécifiques avec les 3 types de Poliovirus I, II et III. Pour eux cette méthode est très sensible, et de ce fait on utilise que de faibles quantités de globulines anti-C', ce qui diminue la marquage non spécifique.

HULTER (75) insiste sur la sensibilité de cette méthode par rapport aux tests de fixation du complément de BORDET-WASSERMAN et de KOLMER.

RIGGS et BROWN (94) ont appliqué le même procédé pour l'identification des virus Poliomyélitiques, virus ECHO et Coxackies. Le problème des Coxackies a été très étudié au Japon par HINUMA et ses Collaborateurs (44), qui ont montré la présence de Coxackies B 5 dans des cellules exfolliées de l'urine de malade.

HINUMA (45) a également cherché à identifier en vue du diagnostic, les virus des maladies respiratoires. Il a travaillé sur des animaux expérimentalement infectés, mais également a recherché ces virus dans l'exsudat nasal de malade. Il a employé la méthode anti-C' fluorescent pour identifier le virus influenzae type A, le para-influenzae (virus Sendai) et l'influenzae type B (souche Yachi), alors que toutes les publications mentionnent l'emploi des méthodes à une ou deux couches pour leurs recherches.

HERS et ses collaborateurs (42) recherchent des agents viraux analogues : para-influenzae I (Sendai) et III (H.A.I.), Réovirus, virus R.S., agents de l'ornithose et de la psittacose, agents de Eaton (pneumonie atypique).

Les rickettsies ont été étudiées par GOLDWASSER et SHEPARD qui mirent leur méthode au point avec ces antigènes, et montrèrent les avantages sur la méthode indirecte en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité lors de la différenciation de plusieurs types de typhus (32).

Ayant à notre disposition un conjugué anti-complément nous avons recherché les virus que nous avons étudié avec la méthode indirecte.

1° - Matériel et technique

a) Cultures cellulaires.

Nous avons employé les mêmes cellules que celles utilisées dans la méthode directe et indirecte pour l'étude de chaque virus. Pour la vaccine nous préférons employer les cellules T aux cellules Hèla qui sont plus souvent altérées. Les cellules de reins de singe demandent plus de suspensions virales infectantes pour obtenir des inclusions virales visibles que les cellules en lignée continue.

La culture du virus sur les cellules est identique à celle décrite pour la vaccine dans la technique directe ou pour les autres virus en technique indirecte.

b) Technique Anti-Complément.

- Premier temps : Les sérums humains ou animaux hyper-immunisés sont décomplémentés par la chaleur à 56° pendant 30 mn. Puis le sérum est dilué au 1/10, 1/100 et 1/1000 avec du complément au 1/10 dilué dans du tampon Mayer-Kraft.

Nous recouvrons les lamelles de Barski avec les dilutions ainsi préparées : le contact est maintenu 45 mn à 37° en chambre humide. Après ce temps de contact les lamelles sont lavées très soigneusement pendant 10 mn en eau physiologique tamponnée à pH 7,2.

- Deuxième temps : Nous appliquons le conjugué anti-C' à la dilution déterminée pour chaque lot d'anti-sérum. Le temps de contact se fait à 37° pendant 30 mn en chambre humide. L'excès de colorant est rejeté par lavage des lamelles puis elles sont montées dans une goutte de glycérine

tamponnée à pH 7,2. Le conjugué avant son emploi est passé sur colonne de Séphadex G 25 puis absorbé sur poudre d'organes.

2° - Résultats

a) Utilisation du conjugué absorbé sur poudre d'organes.

Les images données avec cette méthode pour la recherche du virus vaccinal sont très peu interprétables car nous avons un fond trop fluorescent et d'autre part le contraste entre le cytoplasme et le noyau fluorescent n'est pas assez net.

b) Utilisation de la contre-coloration au Bleu Evans.

Nous pratiquons une extinction de la fluorescence parasite par l'emploi d'une solution de Bleu Evans (84). Après le lavage des lamelles dans le 2ème temps de la réaction, nous trempions les lamelles dans une solution de Bleu Evans au 1/10 000 pendant 10 mn. Cette solution est préparée à partir d'une solution mère au 1/1000 que l'on dilue au moment de l'emploi avec de l'eau physiologique tamponnée pH 7,2.

Puis on fait le montage de la lamelle avec la glycérine tamponnée. La lecture doit être rapide car le Bleu Evans est détruit rapidement sous l'excitation des ultra-violets.

Nous avons un fond rouge sur lequel se détache les cellules infectées en jaune vert fluorescent. Nous avons une baisse sensible de la fluorescence des cellules infectées mais nous pouvons affirmer dans ce cas la présence du virus vaccinal ou du virus grippal.

c) Utilisation du conjugué fractionné sur Séphadex G 200.

Nous employons les fractions F III et F IV du conjugué anti-complément fractionné sur Séphadex G 200. Le conjugué ainsi préparé est concentré puis dialysé contre une solution saline tamponnée pH 7,2 puis filtré sur milipore 45 mu.

La fluorescence parasite de fond est faible et permet une lecture directe sans l'emploi de contre-coloration.

Sérum	Dilution	Complément	Conjugué	Résultats
Sérum de Lapin antivaccine	1/10	C' 1/5	C. 105 F III + IV	++
	1/100			++
	1/1000			+
	1/10	C' 1/10	C. 105 F III + IV	+++
	1/100			+++
	1/1000			+++
	1/10	C' 1/20	C. 105	+
	1/100		F III + IV	+
	1/100	C'	C. 105	-
	1/1000	inactif	F III + IV	-
Sérum humain négatif	1/100	C' 1/10	C. 105 F III + IV	-
Sérum de Lapin herpétique	1/100	C' 1/10		-

TABLEAU XIII

Comparaison de l'intensité de la fluorescence en utilisant
le complément dilué au 1/5 , 1/10 et 1/20.

3° - Discussion

- Réaction.

Les cellules infectées par le virus à étudier sont utilisées en I.F. lorsque celui-ci produit un ECP entre une croix et deux croix. Les lamelles de cellules sont fixées à l'acétone à moins 20° sans lavage au préalable avec de l'eau physiologique.

Les immun-sérums de différentes sources (hommes, singes) sont inactivés à 56° pendant un demi-heure et additionnés du complément. Le mélange est appliqué sur la lamelle pendant le temps usuel d'incubation, puis après un lavage, le conjugué anti-C' fluorescent est appliqué.

Le C' est fixé par tous les anti-sérums spécifiques et peut être employé pour la visualisation des antigènes viraux.

Nous avons mis au point la réaction anti-C' en I.F. en utilisant le virus vaccinal. Nous avons essayé la réaction anti-C' avec des dilutions de complément au 1/5, 1/10, 1/20. (Tableau XIII).

- Vaccine.

La réaction de fluorescence est notée en croix par rapport au résultat donné par la technique directe. Nous obtenons +++ avec le C' 1/10 et nous voyons que la réaction est sensible à une dilution du sérum du 1/100 et même du 1/1000. La réaction est d'autre part spécifique car en employant des cellules infectées avec le virus herpétique nous obtenons une réaction négative.

- Poliovirus.

Avec le Poliovirus nous avons une interprétation délicate des réactions immuno-fluorescentes anti-C' due au manque de spécificité entre les trois types de Poliovirus, et également à la faible fluorescence de cellules infectées.

- Virus R.S.

Les cellules infectées se détachent sur un fond cellulaire à peine fluorescent. Au fort grossissement les cellules infectées sont des cellules géantes avec de nombreux noyaux qui apparaissent en sombre dans un

cytoplasme fluorescent. La sensibilité de la réaction n'est pas très élevée et le titre des sérums dans la réaction anti-C' est faible par rapport à la méthode indirecte.

- Myxovirus influenzae B.

La recherche du Myxovirus influenzae B donne avec la méthode anti-complément les mêmes images qu'avec la méthode indirecte. Le titre du sérum avec la méthode anti-C' est de 1/20 tandis que la méthode indirecte nous donne un titre plus élevé de 1/60.

- Herpès virus.

Les cellules infectées donnent des plages fluorescentes qui se détachent mal sur un fond cellulaire fluorescent. La technique anti-C' donne des images lisibles mais elle ne permet pas d'avoir une sensibilité équivalente à la méthode indirecte.

VIRUS	CELLULES	METHODES	DILUTION	C'	C.	RESULTATS
R. S.	K B	Indirecte	1/20		C. 63	+++
			1/100		1/40	+++
		Anti-C'	1/20	1/10	C. 105	++
			1/100		FIII + IV	+
Herpès	Rein de Singe	Indirecte	1/20		C. 63	+++
			1/60		1/40	+++
		Anti-C'	1/20	1/10	C. 105	++
			1/60		FIII + IV	±
Grippe B	Rein de Singe Vervet	Indirecte	1/20		C. 63	+++
			1/100		1/40	+++
		Anti-C'	1/20	1/10	C. 105	++
			1/40		FIII + IV	+++ ⁺
Polio I I I	Rein de Singe	Indirecte	1/20		C. 63	+++
			1/100		1/40	+++
		Anti C'	1/20	1/10	C. 105	+
			1/100		FIII + IV	+
Vaccine	T	Directe	1/1000		C. 54	+++
			1/10000		1/10	+++
		Anti-C'	1/10	1/10	C. 105	++
			1/100		FIII + IV	+++

TABLEAU XIV

Comparaison de l'emploi de la méthode I. F. directe et de
I. F. indirecte et Anti-C' dans la recherche de virus.

Le tableau XIV montre les essais comparatifs faits avec les différents virus en employant les 3 méthodes d'I.F.

Nous voyons que la technique Anti-C' est applicable pour la recherche des anticorps dans les sérums. Pour l'instant nous avons obtenu des résultats valables pour le groupe Pox-virus et aussi pour la grippe B. Pour l'herpès et le virus respiratoire syncytial la technique est possible mais il faudra avoir un conjugué de titre supérieur pour obtenir une meilleure sensibilité.

Avec le Poliovirus nous avons le plus souvent deux problèmes à résoudre : l'interprétation parfois délicate des préparations et un manque de spécificité entre les trois types de Poliovirus.

CONCLUSIONS

L'étude systématique des techniques d'obtention de sérums anti-complément pouvant être conjugués à des fluorochromes a été entreprise dans le but de les employer pour l'identification des antigènes tissulaires et microbiens au moyen de la réaction d'Immuno-fluorescence.

Des recherches entreprises, pour la production, le titrage et le marquage par le fluorochrome de l'immuno-globuline anti-complément, on peut retenir les faits suivants :

- L'immunisation d'animaux avec des complexes constitués par les stromas d'hématies de mouton ayant subi la lyse par action successive de l'anticorps hémolytique et du complément est de beaucoup préférable à celle comportant l'injection de sérum frais de cobaye ou d'immuno-globulines purifiées.

- Le titrage des sérums anti-complément peut être effectué en utilisant l'hémagglutination conditionnée et l'inhibition de l'activité du complément correspondant à des sérums anti-complément satisfaisants.

- Après "marquage" des sérums avec l'isothiocyanate de fluorescéine il est nécessaire, pour obtenir une plus grande spécificité de la réaction d'immuno-fluorescence, d'effectuer une purification permettant d'obtenir l'immuno-globuline utilisable dans la réaction. La filtration sur gel de Séphadex G 25 suivie d'un fractionnement des immuno-globulines 19 S et 7 S sur Séphadex G 200 puis absorption sur poudre d'organes des globulines 7 S nous a donné les meilleurs résultats.

Dans la deuxième partie de ce travail, et après avoir mis au point les modalités d'emploi du sérum anti-complément conjugué au fluorochrome, nous avons effectué des réactions d'immuno-fluorescence dans le but d'apprécier la valeur de la méthode pour la détection d'antigènes cellulaires, bactériens et viraux.

Pour la détection des auto-anticorps antinucléaires la méthode utilisant le sérum anti-complément marqué, a donné les mêmes résultats globaux que la méthode dite à deux couches utilisant une antiglobuline marquée. En outre, elle a permis d'éliminer un certain nombre de réactions pouvant être considérées comme faussement positives.

Pour la recherche des anticorps anti-tréponémiques au cours de la syphilis, la méthode utilisant le sérum anti-complément donne des réactions d'immuno-fluorescence plus nettes et des lectures plus aisées qu'avec la technique à deux couches. Mais cette dernière méthode donne des titres d'anticorps un peu plus élevés.

Etudiant l'évolution des anticorps anti-tréponémiques détectés par la méthode anti-complément et par la méthode indirecte, nous avons trouvé les mêmes modalités d'évolution au cours et au décours de l'infection.

En virologie, nous avons obtenu des résultats encourageants avec la méthode utilisant le sérum anti-complément pour déceler le poliovirus, le virus respiratoire syncytial et le virus de la vaccine dans des cultures cellulaires infectées. Toutefois les préparations sont moins nettes qu'avec la méthode à deux couches utilisant une antiglobuline marquée. La technique pourra probablement être améliorée.

La réaction d'immuno-fluorescence effectuée avec un sérum anti-complément conjugué à un fluorochrome mérite de retenir l'attention plus qu'elle ne semble l'avoir fait jusqu'ici si l'on tient compte des résultats de notre étude.

On ne saurait cependant affirmer dès maintenant sa supériorité sur les autres techniques. Elle a déjà bénéficié de perfectionnements tant par la préparation des sérums que par leur purification après conjugaison.

Il serait utile, non seulement de tenter d'améliorer, mais aussi de rechercher si les anticorps qu'elle permet de déceler sont les mêmes que ceux révélés par les autres méthodes.

Le Président de la Thèse :
R. SOHIER

VU et permis d'imprimer
LYON, le 16 mai 1967

VU, le Doyen :
J.F. CIER

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBROISE-THOMAS (P.), GARIN (G.P.), Melle RIGAUD (A.) :
Amélioration de la technique d'Immuno-fluorescence par
l'emploi de contre-colorants. Application aux TOXOPLASMES.
Presse Médicale 1966 - 74 - 2215.2216
2. AUDRAN (R.) :
Biologie du Complément.
Biologie Médicale 1960 - 49 - 363.390
3. BECKER (E.L.) :
In Immunochemical approaches to problems in Microbiology.
p. 245
HEIDELBERGER (M.), PLESCIA (O.J.)
New-Jersey - Rutgers University Press.
4. BEUTNER (E.H.) :
Immuno-fluorescent staining : The fluorescent Antibody method.
Bact. Rev. 1961 - 25 - 49.75
5. BEUTNER (E.H.), GOMEZ - USCATEGUI (I.) :
I.F. staining with Human antibodies to thyroid cells with a
human complement staining system.
J. Lab. Clin. Med. 1964 - 5 - 787.795
6. BOYD (W.C.) :
Fundamentals of Immunology.
3rd Ed. Interscience - New-York - p. 176.177 - 632.638
7. BOYDEN (S.V.) :
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic
acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera.
J. Exp. Med. 1951 - 93 - 107.120
8. BREZIN (C.), CANNAT (A.), SEKIGUCHI (M.) :
Présence d'anticorps sériques antinucléaires chez des souris
thymectomisées à la naissance.
Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 1965 - 10 - 839.841
9. BROOKS (J.B.), LEWIS (W.J.), PITTMAN (B.) :
Séparation of fluorescent antibody conjugates in to 7 S and
19 S globulines components by gel-filtration.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1965 - 119 - 748.751

10. BUCKLEY (S.M.) :
Visualisation of Poliomyelitis by fluorescent antibody
Arch. Ges. Virusforsch 1956 - 6 - 388.400
11. BURKHOLDER (P.N.) :
Complément fixation in diseased tissues.
J. Exp. Med. 1961 - 114 - 605.616
12. BURNSTEIN
Nouvelle technique d'isolement d'anticorps spécifiques.
Vx Sang - 1964 - 9 - 22
13. CLARK (H.F.), SCHEPARD (C.C.) :
A. Dialysis technique for preparing fluorescent antibody.
Virology 1963 - 4 - 642.644
14. CIBA Foundation Symposium "Complement" 1965
Ed. G.E. WOLSTENHOLME - Churchill London
15. CHADWICK
Investigation of the unreacted fluorescent material in
fluorescein protein conjugates.
Biochem J. 1959 - 73 - 41
16. CLAYTON (R.M.)
Labeled antibody in the study of differentiation . New
approaches in cell biology.
Ed. Walker - Academic Press - 1960 - 67.88
17. COOMS (A.H.), KAPLAN (M.H.) :
Localization of antigen in tissue cells.
II. Improvements in a method for the detection of antigen
by means of fluorescent antibody.
J. exp. Med. 1950 - 91 - 1.14
18. COOMS (A.H.), LEDUC (E.H.), CONNOLLY (J.M.) :
Studies on antibody production. A method for the histochemical
demonstration of specific antibody and his application to a
study of hyper immune rabbit.
J. Exp. Med. 1955 - 102 - 49.60
19. CURTAIN (C.C.)
Electrophoresis of fluorescent antibody.
Nature 1958 - 182 - 1305

20. DELOH (R.E.), HOLMES (A.W.), DEINHARDT (F.) :
Preparation of FITC labeled gamma globulin by dialysis gel filtration, and ion-exchange chromatography in combination
J. Bact. 1965 - 89 - 734
21. EHRLICH (P.), MORGENROTH (J.);
Huber Hémolysine.
Berl. Klin Woch 1899 - 36 - 481
22. ELLIS (H.A.), GELL (P.H.) :
Immunological estimation of a component of complement.
Nature 1958 - 181 - 1667
23. FLODIN (P.), KILLANDER (J.):
Fractionation of human serum proteins by gel filtration.
J. Biochem. Biophys. Acta 63 - 1962 - 403.410
24. FOTHERGILL (J.E.), NAIRN (R.C.)
Purification of fluorescent protein conjugates : comparaison of charcoal and "Sephadex".
Nature 1961 - 192 - 1073.1074
25. FROMHAGEN (L.H.), SPENDLOVE (R.J.) :
The staining properties of human serum proteins conjugated with purified fluorescein iso thiocyanate.
J. Immunology 1962 - 89 - 124.131
26. FROMHAGEN (L.H.)
The solubility and other physicochemical properties of human gamma globulins labeled with fluorecein isothiocyanate.
J. Immunology 1965 - 95 - 442.445
27. FREUND (J.) and Coll. :
Antibody formation and sensitization with aid of adjuvants.
J. Immunology 1948 - 60 - 383.398
28. GOLDMAN (M.), CARVER (R.K.)
Preserveing fluorecein iso cyanate for simplified preparation fluorecent antibody.
Science 1957 - 126 - 839
29. GOLDSTEIN (G.), SLIZYS (I.), CHASE (M.R.) :
Studies on fluorecent antibody staining.
I. Non specific fluorescence with fluorescein coupled streep anti rabbit globulins.
J. Exp. Med. 1961 - 114 - 98

30. GOLDWASSER (R.A.), KISSLING (R.E.) :
Fluorescent antibody staining of street and fixed rabbit virus antigens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958 - 98 - 219
31. GOLDWASSER (R.A.), SHEPARD (C.C.) :
Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedures.
J. Immunology 1958 - 80 - 122
32. GOLDWASSER (R.A.), SHEPARD (C.C.) :
Fluorescent antibody methods in the differentiation of murine and epidemic typhus sera ; specificity changes resulting from previous immunisation.
J. Immunology 1959 - 82 - 373.375
33. GORDON (M.A.), EDWARDS (M.R.), TOMKINS (V.N.) :
Refinement of Fluorescent antibody by gel filtration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962 - 109 - 96
34. GORNALL (A.G.), BARDWILL (D.J.), DAVID (M.M.) :
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem. 1949 - 117 - 751
35. Melle GROPIRON (D.) :
Etude des techniques d'I.F. appliquées au diagnostic sérologique des tréponématoses.
Thèse Lyon 1961
36. GROSSI (C.E.) :
L'analisi cromatografica su colonna di DEHE cellulosa per la separazione dai coniugati fluorescenti dei componenti attivi specificamente nelle reazioni immunoistochimiche.
Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 1964 - 40 - 2207.2214
37. GYENES (L.), SEHON (A.M.) :
Preparation and evaluation of polystyrene-antigen conjugate for the isolation of antibody.
Canad. J. Biochem. 1960 - 38 - 1235.1248
38. HAINES (A.L.), LEPOW (I.H.) :
Studies on human C'1 esterase.
I. Purification and enzymatic properties.
J. Immunologie 1964 - 92 - 456.468.479
39. HALIKIS (D.N.), ARQUILLA (E.R.) :
Studies on the physical, immunological and biological properties of insulin conjugated with FITC.

40. HARBOE (M.), MULLER-EBERHARD (H.J.) :
Identification of the components of C' participating in the
anti-globulin reaction.
Immunology 1963 - 6 - 412
41. HENLE (G.), HENLE (W.) :
Cross reactions among gamma globulins of various species
in indirect immuno fluorescence
J. Immunology 1965 - 95 - 118
42. HEERS (J.F.Ph.) :
Fluorescent antibody technique in respiratory viral diseases
Amer. Rev. resp. dis. 1963 - 88 - 317
43. HINUMA (Y.), HUMMELER (K.) :
Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis.
III. Intracellular developpement of antigen.
J. Immunology 1961 - 87 - 367
44. HINUMA (Y.), and Coll. :
Detection of Coxackie virus antigen in urinary cells by if.
Lancet 1962 - 7248 - 179
45. HINUMA (Y.) and Coll. :
Evaluation of the complement method of fluorescent antibody
technique with Myxoviruses.
J. Immunol. 1962 - 89 - 19,26
46. HOKENSON (E.O.), HANSEN (P.A.) :
Flazo orange for masking of auto and non specific fluorescence
of leukocytes and tissus cells.
Stain - technology 1966 - 41 - 9,14
47. ISCHIDA (N.), HINUMA (Y.), OHTA (R.) :
Practical aspects of the fluorescent antibody method.
I. With special regard to the complement method.
Jap. J. Clin. pathologique 1961 - 9 - 470
48. JETER (W.S.), Mc KEE (A.P.) :
Some physical and chemical properties of antibody against
complément.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957 - 96 - 118
49. JOHNSON (J.D.) :
Simplified procedure for removing non specific staining
components from fluorescein labelled conjugates.
50. KABAT (E.H.), MAYER (M.M.) :
Experimental Immuno Chemistry
Charles C. Thomas, Springfield Illinois 1948 p. 97.139

51. KAUFMAN (L.), CHERRY (W.B.) :
Technical factors affecting the preparation of fluorescent antibody.
J. Immunol. 1961 - 87 - 72
52. KIRSH (D.), KISSLING (R.) :
The use of I.F. in the rapid presumptive diagnostic of variola.
Bull. O.M.S. 1963 - 29 - 126
53. KLEIN (P.G.) :
Studies on immune hemolysis : preparation of a stable and highly reactive complex of sensitized erythrocytes and the first component of complement. Inactivation of cell-fixed C'1, by some complement reagents.
J. Exptl. Med. 1960 - 11 - 77
54. KLEIN (P.G.) :
On light optical demonstration of complement fixation in the Masugi Kidney with labelled anti-complement.
Allergie Asthmeforcesch 1961 - 4 - 306,308
55. KLEIN (P.G.), BURKHOLDER (P.M.) :
Die Darstellung von fixierten komplement mit markiertem Anti-Komplement.
Schweiz. Z. Path. Bakt. - 22 - 729
56. KLEIN (P.G.), BURKHOLDER (P.M.)
Ein verfahren zur Fluoreszenzoptischen Darstellung der komplement bindung und seine anwendung Zur Histoimmunologischen Untersuchung der Experimentellen anaphylaxie.
Deutsch. Med. Woch. 1959 - 84 - 2001
57. KLEIN (P.G.), BURKHOLDER (P.M.) :
I. Studies of the antigen properties of complement.
II. Analysis of specific agglutinins against certain components of guinea-pig complement fixed on sensitized sheep erythrocytes.
J. Exptl. 1960 - 111 - 107
58. KLEIN (P.G.), BURKHOLDER (P.M.) :
I. Studies of antigen properties of complement.
II. Demonstration of agglutinating antibodies against guinea pig complement fixed on sensitized sheep erythrocytes.
J. Exptl. 1960 - 111 - 93
59. NELLE KRATCHKO (A.) :
La recherche des auto-anticorps antinucléaires par la technique quantitative d'immuno-fluorescence.
Thèse : LYON 1961

60. Melle KRATCHKO (A.), NETTER (R.), THIVOLET (J.) :
Méthode rapide de recherche du virus vaccinal par mise en culture sur cellule et identification par immuno-fluorescence directe.
Annal. Pasteur 1964 - 107 - 183.191
61. LACHMANN (P.J.), MULLER-EBERHARD (H.J.), KULKEN (H.G.), PARONETTO (F.) :
The localization of in vivo bound complement in tissue sections.
J. Exptl. Med. 1962 - 115 - 63
62. LEPOU (I.H.) :
In Mechanisms of hypersensitivity . n 267
Ed. Shaffer (J.H.) Boston - Little Brown and Co.
63. LINSOTT (W.D.), COCHRANE (C.G.) :
Guinea-pig B1C globulin : its relationship to the third component of C' and its alteration following interaction with immune complexes.
J. Immunol. 1964 - 93 - 972.984
64. LINSOTT (W.D.), NICHIOKA (K.) :
Components of guinea-pig complement.
I. Separation of a serum fraction essential for immune hemolysis and immune adherence.
J. Exptl. Med. 1963 - 118 - 784
65. LOISELEUR
Technique de Laboratoire.
Tome I Fasc. II p. 1067 - 3° Ed. Masson Paris.
66. MAKITA-YUTAKA
Further studies of the anti-complement.
Med. J. Shin S.H. Univ. 1960 - 5 - 203
67. Mac KEE (A.P.), JETER (W.S.) :
Effect of an antibody complement on resistance and immunity.
J. Immunol. 1962 - 88 - 702
68. Mac KEE (A.P.), JETER (W.S.) :
The demonstration of an antibody against complement.
J. Immunol. 1956 - 76 - 112
69. Mac KINNEY (R.M.), SPILLANE (J.P.), PEARCE (J.W.) :
Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins.
J. Immunol. 1964 - 93 - 232.241
70. MARSHALL (J.D.), EVELAND (W.C.), SMITH (C.W.) :
Supériority of fluorescein isothiocyanate for fluorescent antibody technique with a modification of its applications.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958 - 98 - 898

71. MAYER (M.M.) :
In experimental immuno-chemistry (Chapitre IV)
by KABAT (E.A.) et MAYER (M.M.)
Edition Springfield - Thomas C.C.
72. MAYER (M.M.), LEVINE (L.), RAPP (H.J.), MARUCCI (A.A.) :
Kinetic studies on immune hemolysis.
VII. Decay of EAC'142 fixation of C'3 and other factors
influencing the hemolytic action of the complement.
J. Immunol. 1954 - 72 - 511 et 73 - 443
73. MAYERSBACH (H.), SCHUBERT (G.) :
Die Unspezifischen Reaktionen Zwischen markierten seren
und Geweben bei der immunohistologischen technick.
Acta. Histochem. 1960 - 10 - 44
74. MONIER (J.C.), RUEL (J.P.), RICHARD (M.H.) :
Facteurs antinucléaires spécifiques du noyau de Trypanosome:
Type - Nature - Signification.
Ann. Inst. Pasteur 1967.
75. MULLER (F.) :
Quantitative untersuchungen über den direkten und indirekten
fluoreszenz serologischen Nachweis der komplement bindung an
enterovirus - anti-körper-Komplexe.
Arch. GES Virus forch 1961 - 11 - 400
76. MULLER (F.), KLEIN (P.G.) :
Fluoreszenz serologische Darstellung der komplement bindung
an virus anti-körper-Komplexe in der Gewebekultur.
Deutsch. Med. Wschr. 1959 - 84 - 21.84
77. MULLER-EBERHARD (H.J.), BALMASSO (A.P.), CALCOTT (M.A.) :
The reaction mechanism of B1C globulin (C'3) in immune hemolysis
J. Exp. Med. 1966 - 123 - 33
78. MULLER-EBERHARD (H.J.), BIRO (L.E.) :
Isolation and description of the fourth component of human C'1.
J. Exp. Med. 1963 - 118 - 447
79. MULLER-EBERHARD (H.J.), NILSSON (U.), ARONSON (T.) :
Isolation and caractérisation of two beta I glyco-proteins
of human serum.
J. Exp. Med. 1960 - 111 - 201
80. MULLER-EBERHARD (H.J.), NILSSON (U.), ARONSON (T.) :
Relation of a beta I glyco-protein of human serum to the
complement system.
J. Exp. Med. 1960 - 111 - 217

81. MURRAY (H.G.S.) :
The diagnostic of small pox by immuno-fluorescence.
Lancet 1963 - 7 286 - 847
82. MUTSAMERS (W.) :
Recherches concernant l'alexine - de l'existence des anti-alexine.
Annal. Institut Pasteur 1947 - 43 - 385
83. NAIRN (R.C.) :
Fluorescent Protein Tracing.
2nd Livingstone (E.S.) London
84. NICHOLS (R.L.), Mc COMB (D.E.), HADDAD (W.), MURRAY (E.S.) :
Studies on trachoma.
II. Comparison of fluorescent antibody, Giemsa and Egg isolation methods for detection of trachoma virus in human conjunctival scrapings.
Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1963 - 12 - 223
85. ORTEGA (L.G.), MELIORS (R.C.) :
The role of localized antibodies in the pathogenesis of nephrotoxic nephritis in the rat.
J. Exp. Med. 1956 - 104 - 151.170
86. OUCHTERLONY (O.) :
Antigen antibody reactions in gels.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1949 - 26 - 507
87. PELTON (F.), PONDAM (K.W.) :
The significance of antigen-antibody complement reaction.
Vx Sang. (Basel) 1963 - 8 - 605
88. PERUSSIA (F.) :
Huber die Antikörper des Komplements.
Z. Immunforsch 1911 - 11 - 287
89. PETERS (J.H.), Mc DEWITT (H.O.), POLLARD (L.W.), HARTER (J.G.), COONS (A.H.) :
Purification of fluorescent conjugat by column chromatography.
Fed. Proc. 1961 - 20 - 17
90. PETERSON (E.A.), SOBER (H.A.) :
Chromatography of proteins : cellulose ion exchange absorbent.
J. Amm. Chem. Soc. 1956 - 78 - 751
91. PITAL (A.), JANOWITZ (S.L.) :
Enhancement of staining intensity in the fluorescent antibody reaction.
J. Bacteriol. 1963 - 86 - 883

92. PRESSMANN (D.), CAMPBELL (D.H.), PAULING (L.) :
The agglutination of intact azo-erythrocyte by anti-sera homologous to the attached group.
J. Immunolog. 1942 - 44 - 101,105
93. PROOM (H.) :
The preparation of precipitating sera for the identification of animal species.
J. Path. Bact. 1943 - 55 - 419,426
94. RIGGS (J.L.), BROWN (G.C.) :
Application of direct and indirect immuno-fluorescence for identification of enteroviruses and titrating their antibodies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962 - 110 - 833
95. RIGGS (J.L.), LOH (P.C.), EVELAND (W.C.) :
A simple fractionation method for preparation of fluorescent labelled gamma-globulin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960 - 105 - 655,658
96. RIGGS (J.L.), SEIWALD (R.J.), BURCKHALDER (J.H.), DOWNS (C.M.), METCALF (T.G.) :
Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immun serum.
Amer. J. Path. 1958 - 34 - 181,197
97. SCHEIDEGGER (J.J.) :
Une micro-étude de l'immuno-électrophorèse.
Intern. Arch. Allergy appli. Immunol. 1955 - 7 - 103
98. SMITH (C.W.), MARSHALL (J.D.), EVELAND (W.C.) :
Use of a contrasting fluorescent dye as counterstain in fixed preparations.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959 - 102 - 179
99. STANFORTH (D.R.) :
Rapid method of preparing pure serum gamma globulin.
Nature 1960 - 188 - 156
100. STATTON (F.), GUNSON (H.H.) :
Anticomplement antiglobulin reagents.
Nature 1963 - 198 - 554,556
101. STETSITSKY (A.B.) :
Micro-method for the study of proteins and antibodies.
I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutinin-inhibition reactions with tannic acid protein treated red blood-cells.

102. STAVITSKY (A.B.) :
 Micro-method for the study of proteins and antibodies.
 2. Specific application of hemagglutination and hemagglutinin-inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood-cells.
 J. Immunol. 1954 - 72 - 360.367 - 368.375
103. STEINBUCH (M.), QUENUM (M.), PEJAUDIER (L.) :
 A simple technique for the isolation of beta 1 C (beta 1 A) globulin.
 Nature 1963 - 200 - 262
104. STRAUSS (A.J.L.) :
 Immuno-fluorescence demonstration of a muscles binding complement fixing serum globulin fraction in Myasthenia gravis.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960 - 105 - 184
105. THIVOLET (J.), KRATCHKO (A.), SEPTDJAN (M.) :
 Utilisation de la méthode d'I.F. pour les diagnostics immunologiques.
 Presse Med. 1963 - 55 - 2740.2742
106. THIVOLET (J.), MONIER (J.C.), LALAIN (F.), RICHARD (M.H.) :
 Recherche quantitative simultanée des anticorps antinucléaires totaux et anti-acides désoxyribonucléiques sur frottis de sang de souris parasité par trypanosoma gambiense.
 Annales Institut Pasteur 1965 - 109 - 815.830
107. THIVOLET (J.), MONIER (J.C.), RUEL (J.P.), RICHARD (M.M.) :
 Production d'anticorps chez la souris Swiss thymectomisée à la naissance.
 Nature 1967.
108. VOGT (A.), KOCHEN (H.J.) :
 Histo-serologische untersuchungen mit fluorescein-markierten anti-komplement.
 Z. Zellforsch. U. Mikroskop. Anat. 1960 - 52 - 640
109. WELLER (J.H.), COONS (A.H.)
 Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes roster propagated in vitro.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med 1959 - 36 - 789
110. WHITE (R.G.), COONS (A.H.), CONNOLLY (J.M.) :
 Studies on antibody production.
 2. The alum granuloma.
 J. Exp. Med. 1955 - 102 - 73.82

111. WHITE (R.G.), COONS (A.H.), CONNOLLY (J.M.) :
Studies on antibody production.
4. The role of a wax fraction of mycobacterium tuberculosis
in adjuvant emulsion on the production of antibody to egg
albumine.
J. Exp. Med. 1955 - 102 - 83.104
112. ZEMAN (J.), VAN DAM (A.F.)
Rapide séparation of fluorescent anti-sérum and un conjugated
dye.
Acta Histochem. (Jema) 1961 - 11 - 306.308

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
--------------	---

1ère PARTIE -

CHAPITRE I -	Le Complément	7
	Nature et structure du complément	7
	Rôle du complément en immunologie	8
	Rôle des composants du complément dans la réaction d'I.F.	11
CHAPITRE II -	Préparation des sérums anti-complément	12
	Immunisation selon la technique de :	
	MUTSAARS	13
	HINUMA-HUMELER	13
	HINUMA-OHTA modifiée	13
	BEUTNER	16
CHAPITRE III -	Titrages des anti-sérums	22
	Méthode immunologique qualitative	23
	Méthode immunologique quantitative	24
CHAPITRE IV -	Marquage des immun-sérums	40
	Principe	40
	Réalisation	40
CHAPITRE V -	Purification des conjugués	45
	Le fluorochrome	46
	Les immunoglobulines	58
	La conjugaison	64
	L'autofluorescence	68

<u>IIème PARTIE</u>	Utilisation des conjugués anti-complément	70
CHAPITRE I -	Recherche des auto-anticorps antinucléaires	70
	Technique de la méthode anti-complément	71
	Comparaison de la méthode anti-C' et de la méthode indirecte en I.F.	76
	Utilisation de l'I.F. indirecte et anti-C' pour la recherche des auto-AC chez la souris thymectomisée	89
CHAPITRE II -	Recherche des anticorps anti-tréponémiques	94
	Technique de la méthode d'I.F. indirecte	95
	Technique de la méthode d'I.F. anti-C'	97
	Résultats comparés en I.F. indirecte et en I.F. anti-C'	106
CHAPITRE III -	Recherche en Virologie	115
	Modalités techniques	116
	Applications pratiques	117
	I.F. en couche directe	117
	I.F. en couche indirecte	119
	I.F. anti-C'	123
CONCLUSIONS		136
BIBLIOGRAPHIE		139

